



Phototransformation de matières actives à la surface des végétaux . Mécanismes des réactions directes et sensibilisées

Shirin Mohammad Ali Monadjemi

► To cite this version:

Shirin Mohammad Ali Monadjemi. Phototransformation de matières actives à la surface des végétaux . Mécanismes des réactions directes et sensibilisées. Autre. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2012. Français. NNT : 2012CLF22318 . tel-00836760

HAL Id: tel-00836760

<https://theses.hal.science/tel-00836760>

Submitted on 21 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Numéro d'ordre : D.U. 2318

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

U.F.R. Sciences et Technologies

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

N° 737

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Chimie Physique

Par

Shirin MOHAMMAD ALI MONADJEMI

Diplômée du Master 2 Recherche :

Chimie Analytique, Réactionnelle et Modélisation en Environnement

**Phototransformation de matières actives à la surface des végétaux.
Mécanismes des réactions directes et sensibilisées.**

Soutenue publiquement le 14 décembre 2012 devant la commission d'examen.

Président :

Dr. Serge CHIRON (DR, IRD, Université de Montpellier II)

Rapporteurs :

Dr. Esther OLIVEROS (DR, Université de Paul Sabatier, Toulouse III)

Dr. Norbert HOFFMANN (DR, Université de Reims Champagne-Ardennes)

Examineurs :

Dr. Claire RICHARD (DR, CNRS, Université de Blaise Pascal, Clermont-Ferrand)

Dr. Alexandra TER HALLE (CR, Université de Paul Sabatier, Toulouse III)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à Madame Claire Richard pour la confiance qu'elle m'a accordée en m'accueillant au sein du Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire. Je la remercie de m'avoir généreusement et patiemment transmis ses connaissances ainsi que pour sa grande disponibilité.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Madame Alexandra Ter Halle pour m'avoir guidée au cours de cette thèse, d'avoir partagé ses excellentes idées scientifiques et de m'avoir initiée à la phyto-chimie. Merci de m'avoir révélé ce merveilleux domaine.

Je souhaiterais également remercier tous les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail. Je remercie tout particulièrement Monsieur Serge Chiron pour avoir présidé ce jury. Je suis très reconnaissante à Madame Esther Oliveros et à Monsieur Norbert Hoffmann pour le temps qu'ils ont accordé à la lecture de cette thèse et à l'élaboration de leur rapport.

Merci

à Pascale Goupil et Razik Benouaret pour m'avoir fourni les plants de tabac que vous avez soigneusement fait pousser. Je les ai soigneusement disséqués...

à Martine Sancelme qui m'a initiée à la microbiologie. Merci pour la patience avec laquelle tu as préparé les milieux de culture.

à Bertrand Légeret pour son aide dans les analyses de spectrométrie de masse et Isabelle Thomas pour les analyses RMN.

Laure Pison et Margarida Costa-Gomes leur aide sur les mesures de perméabilité des cires.

Aux collègues du laboratoire et en particulier à Mohammed Sarakha et Pascal Wong-Wah-Chung pour leurs conseils judicieux. Je garderai de très bons souvenirs de notre séjour à Coimbra et des plats de bacalhau à toutes les sauces... Marcello Brigante et Ghislain Guyot pour leurs encouragements et leurs remarques pertinentes.

Je tiens à exprimer toute ma sympathie à Eliana de Sousa, Šárka Paušová, Marie Siampiringue, Natacha Arlie, Claudia Swanson, Tiffany Charbouillot, Claire Madeleine-Perdrillat, Cyril Le Fur et Aurélien Trivella, pour leur soutien et leur gentillesse. Même les opérations les plus tardives dans la soirée furent agréables quand elles se déroulaient à vos côtés. Merci aussi à Geoffrey Chastain qui m'a toujours généreusement prêté son matériel de laboratoire, parfois sans en être informé... je l'accorde. Je te remercie aussi pour ta bonne humeur et pour t'être prêté au jeu pour parler le persan. Tu es le petit rayon de soleil qui illumine le laboratoire de photochimie. Enfin, je voudrais adresser mes remerciements à l'ensemble des personnes que j'ai pu côtoyer tout au long de ma thèse et que j'ai oublié de mentionner.

J'adresse aussi ma plus profonde reconnaissance à ma mère qui m'a soutenue dans toutes les épreuves et qui m'a offert les meilleures conditions pour que je puisse continuer des études et m'épanouir. Tu es ma source d'énergie.

J'ai aussi une pensée très tendre pour Loïc. Merci pour tes encouragements, ta patience et ta générosité.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Devenir des pesticides après leur pulvérisation.....	5
1.1 La volatilisation.....	5
1.2 Le ruissellement.....	6
1.3 Pénétration dans la plante et métabolisation.....	6
1.4 La biodégradation	6
1.5 La photodégradation.....	7
1.6 Contributions relatives de ces différentes voies de dissipation.....	7
2. La surface foliaire.....	7
2.1 Structure de la cuticule.....	7
2.2 Métabolites secondaires des plantes.....	9
3. Formulations et agents d'étalement.....	10
4. Phototransformation des pesticides à la surface des feuilles.....	11
5. Mécanismes de phototransformation.....	18

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1. Produits chimiques utilisés, pureté et provenance.....	27
2. Etudes en solution.....	28
2.1 Irradiations monochromatiques.....	28
2.2 Actinométrie.....	29
2.3 Analyse par photolyse laser flash.....	29
3. Dépôt et irradiation des pesticides à la surface des films de cire.....	29
3.1 Réalisation des films épais.....	30
3.2 Traitement des films.....	30
3.2.1 Préparation des solutions.....	30
3.2.2 Application du pesticide.....	31
3.3 Irradiation des films.....	31
3.4 Actinométrie.....	31
3.5 Rinçage des films.....	32
3.6 Cinétique de dissipation.....	32
4. Inclusion et irradiation des sensibilisateurs dans les films de cire.....	33
4.1 Préparation des films.....	33
4.2 Irradiation et analyse des films.....	34
4.3 Spectre UV-Visible des films.....	34
5. Etude sur les cuticules isolées.....	35
6. Etude sur les feuilles de tabac.....	36
6.1 Application du pesticide.....	36
6.2 Irradiation des feuilles.....	36
6.3 Rinçage des feuilles.....	36

7. Culture du champignon <i>Cercospora nicotianae</i> et extraction de sa phototoxine.....	37
7.1 Préparation du milieu de culture.....	37
7.2 Culture du champignon.....	37
7.3 Extraction et purification de la cercosporine.....	37
7.4 Contamination des feuilles.....	38
8. Méthodes analytiques.....	39
8.1 Spectroscopie UV-Visible.....	39
8.2 Chromatographie liquide.....	39
8.3 Spectrométrie de masse.....	41
9. Cinétique de phototransformation et tracé des courbes sur film de cire.....	41

CHAPITRE III : PHOTOTRANSFORMATION DU CHLOROTHALONIL

1. Introduction.....	46
2. Données sur le chlorothalonil.....	47
2.1 Propriétés physico-chimiques.....	47
2.2 Devenir dans l'environnement-photolyse.....	48
3. Photochimie du chlorothalonil sur cire.....	50
3.1 Photoreduction of chlorothalonil fungicide on plant leaf models.....	50
3.2 Expériences complémentaires.....	69
3.3 Synthèse de l'article et des expériences complémentaires.....	72
4. Tentatives de dosage du chlorothalonil dans et sur des cuticules de plantes par IR.....	73
5. Dosage dans la cire par spectroscopie UV-Visible.....	76
6. Conclusion.....	77

CHAPITRE IV : REACTIVITE DES PESTICIDES AVEC L'OXYGENE SINGULET

1. Introduction.....	81
2. Réactivité avec l'oxygène singulet des pesticides choisis.....	84

CHAPITRE V : PHOTOTRANSFORMATION DE LA CYCLOXYDIME

1. Introduction.....	87
2. Etude bibliographique.....	88
2.1 Les cyclohexanediones oximes.....	88
2.2 Devenir dans l'environnement.....	90
2.2.1 Hydrolyse.....	90
2.2.2 Photolyse.....	90
2.2.3 Nature des photoproduits.....	90
2.3 Cas particulier de la cycloxydime.....	91
3. Phototransformation de la cycloxydime en solution.....	93
3.1 Etude de la structure de la cycloxydime par résonance magnétique nucléaire.....	93
3.2 Propriétés spectrales de la cycloxydime.....	96
3.3 Phototransformation de la cycloxydime-mesure du rendement quantique de photodégradation.....	97
3.4 Réactivité de la cycloxydime avec l'oxygène singulet.....	97

3.4.1	Reactivity of cycloxydim toward singlet oxygen in solution and on wax film.....	98
3.4.2	Réaction en l'absence d'oxygène.....	104
3.4.3	Réaction de CD avec $^1\text{O}_2$ dans l'eau.....	104
3.4.4	Synthèse de l'article et des expériences complémentaires.....	105
4.	Photoréactivité de la cycloxydime en phase solide.....	106
4.1	Influence de la nature du solvant utilisé pour le dépôt.....	106
4.2	Influence du volume de dépôt et de la taille des gouttes.....	107
4.3	Influence de la formulation.....	109
4.4	Influence de la nature du support.....	110
4.5	Effet de CT sur la photodégradation de la cycloxydime.....	112
5.	Conclusion.....	114

CHAPITRE VI : PHOTSENSIBILISATION PAR LES PHYTOALEXINES

1.	Introduction.....	118
2.	Etude bibliographique.....	119
2.1	Généralités.....	119
2.2	Données sur les espèces transitoires.....	122
3.	Etude des espèces transitoires en solution.....	124
3.1	Etude de khellin en solution.....	124
3.1.1	Irradiation de K seule.....	124
3.1.2	Irradiation de K en présence de capteurs potentiels.....	125
3.2	Etude du visnagin en solution.....	125
3.2.1	Irradiation de V seul.....	125
3.2.2	Irradiation de V en présence de capteurs potentiels.....	127
4.	Photoréactivité en solution de la cycloxydime en présence de visnagin.....	129
4.1	Etude en irradiations continues.....	130
4.2	Etude par photolyse laser flash : réactivité de $^3\text{V}^*$ avec CD.....	130
4.3	Interprétation des résultats.....	133
5.	Photoréactivité en phase solide de la cycloxydime en présence de visnagin et de khellin.....	137
5.1	Singlet oxygen production by phytoalexins in wax films-Article soumis.....	138
5.2	Photodégradation de la cycloxydime sur cire.....	154
6.	Conclusion.....	155

CHAPITRE VII: CARACTERISATION DES PHOTOPRODUITS DE LA CYCLOXYDIME

1.	Introduction.....	158
2.	Détection des photoproduits en solution.....	159
3.	Détection des photoproduits sur support solide.....	161
4.	Comparaison des résultats en solution et sur cire.....	162
5.	Identification des photoproduits.....	163
5.1	Photoproduits issus de la perte de l'éthoxylate.....	163
5.2	Produits issus de l'oxydation.....	165
5.3	Produits issus de l'oxydation de la cire.....	167

6. Suivi au cours du temps des photoproduits sur support solide.....	169
6.1 CD sur cire de paraffine pure.....	170
6.2 CD sur film de cire contenant K.....	170
7. Discussion.....	172
8. Conclusion.....	175

CHAPITRE VIII : PHOTSENSIBILISATION PAR LA CERCOSPORIN

1. Introduction.....	178
2. Bibliographie.....	179
3. Analyses en solution.....	181
3.1 Spectres d'absorption et de fluorescence.....	181
3.2 Réactivité de la cercosporin avec la cycloxydime en solution.....	182
3.3 Spectre d'absorption du transitoire.....	183
4. Contamination des feuilles de tabac.....	185

CONCLUSION GENERALE

Abréviations

Abs : absorption
ATR : attenuated total reflectance
CD : cycloxydime
CI : conversion interne
COD : carbone organique dissous
CSP : cercosporin
CT : chlorothalonil
DABCO : 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane
DAD : diode array detector
DPBF : 1,3 diphénylsiobenzofurane
ESI : electrospray ionization
F : fluorescence
HPLC : high performance liquid chromatography
K : khellin
K_{OW} : constante de partage octanol/eau
k_d : constante de vitesse de désactivation
k_q : constante de vitesse de quenching (désactivation bimoléculaire)
LMD : limite de détection
LMQ : limite de quantification
MOD : matière organique dissoute
NR : processus non radiatif
P : phénalénone
PDA : potato dextrose agar
Ph : phosphorescence
PNA : *para*-nitroanisole
RMN : résonance magnétique nucléaire
TIS : transition intersystème
TMP : 2,4,6-triméthylphénol
V : visnagin

INTRODUCTION

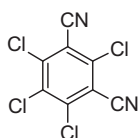
Pour répondre aux besoins d'une population grandissante, l'agriculture moderne fait appel aux traitements chimiques et utilise en grande quantité des produits phytosanitaires, plus communément appelés pesticides. Sous ce nom générique se trouvent regroupés une grande variété de composés qui ont pour fonction de détruire ou de repousser les ravageurs et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux qui causent des dommages aux produits agricoles, aux denrées alimentaires, au bois et aux produits ligneux ou aux aliments pour animaux. Font également partie de cette famille les régulateurs de croissance des plantes et les substances appliquées avant ou après récolte pour empêcher la détérioration des produits pendant leur stockage ou leur transport. Les herbicides, fongicides et insecticides sont principalement utilisés pour protéger les cultures contre les adventices et les organismes nuisibles afin d'améliorer les rendements agricoles et la qualité des produits. Les productions les plus consommatrices sont les céréales et le colza par l'étendue des surfaces concernées et d'autres cultures telles que la vigne par l'intensité des applications ou par leur fragilité.

La France est la première puissance agro-alimentaire d'Europe. Elle est aussi de ce fait, le premier pays consommateur de pesticides en Europe et le 4^{ème} au niveau mondial derrière les Etats-Unis, le Brésil et le Japon. Même si elle s'avère indispensable, l'utilisation massive des pesticides sur les cultures conduit inévitablement à une pollution chimique des différents compartiments environnementaux et notamment des eaux de surface et du sol. Devant ces pollutions et les inquiétudes qu'elles suscitent sur le plan sanitaire, des mesures réglementaires de réduction des pesticides sont envisagées en France. Ainsi, le Grenelle de l'environnement (2007) a élaboré le plan Ecophyto 2018 qui vise en particulier au retrait du marché des produits les plus préoccupants, à l'interdiction de l'épandage aérien sauf sur dérogation et à la réduction, si possible, de 50% l'usage des pesticides d'ici 2018. Ces efforts de réduction sonnent comme un défi car ils doivent être menés tout en continuant à assurer un niveau de production élevé tant en quantité qu'en qualité.

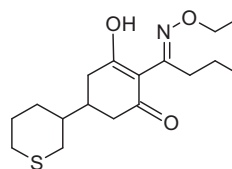
Face à ces mesures de réduction d'utilisation, il est essentiel de rendre les traitements plus efficaces et notamment de limiter les pertes en pesticides entre le moment où ils sont pulvérisés sur les cultures et celui où ils atteignent leur cible afin de remplir leur fonction phytosanitaire. L'optimisation des traitements fait donc l'objet d'une recherche intensive, elle passe par l'élaboration d'une formulation la plus adéquate possible afin d'aider la matière active à remplir son rôle. Il est tout aussi important de protéger les matières actives des phénomènes de dégradation, en particulier de photodégradation qu'elles subissent pendant tout le temps où elles sont déposées sur les feuilles ou qu'elles ont juste pénétré dans la cuticule. Si les herbicides qui ont vocation à détruire les plantes non-culturelles (communément appelées mauvaises herbes) ne sont pas destinés à rester très longtemps sur les plantes, il faut quand même leur laisser le temps de pénétrer dans la plante. Les fongicides et les insecticides quant à eux, en fonction de leur mode d'action, doivent parfois persister beaucoup plus longtemps à la surface des végétaux et la possible photodégradation devient alors un phénomène très pénalisant. Or ces aspects réactionnels, bien que connus des industriels, sont assez peu considérés jusqu'à présent.

Ce travail de thèse a eu pour objectif de documenter cette question. Nous avons cherché à évaluer et à comprendre la photodégradabilité des matières actives dans les conditions les plus proches possibles des conditions réelles où elles se trouvent juste après pulvérisation, c'est-à-dire sous forme de dépôt sec à la surface des feuilles. Nous nous intéressons donc au pesticide dans la première partie de son existence, c'est-à-dire lorsqu'il est utile et considéré comme une matière à préserver. A ce stade, la photodégradation a un impact négatif car elle réduit la durée de vie de la matière active. Après qu'ils aient remplis leur fonction, les pesticides deviennent des micropolluants au même titre que tout composé organique xénobiotique et leur dégradabilité, qu'elle soit biotique ou abiotique, devient alors un phénomène positif dans la mesure où elle transforme la matière active en sous-produits moins toxiques que le composé de départ. Ceci n'est d'ailleurs pas toujours le cas.

Comprendre les réactions de photodégradation à la surface des feuilles est une étape indispensable si l'on veut mettre en place des méthodes de photoprotection pour préserver la matière active et allonger sa durée de vie. Au cours de cette thèse, j'ai étudié la phototransformation sur supports modèles de feuilles de deux composés : le chlorothalonil, qui est un fongicide chloré assez ancien mais encore très utilisé et la cycloxydime, qui est un herbicide de la famille des cyclohexanones. Dans le cas du chlorothalonil, nous nous sommes intéressés à la phototransformation appelée directe car elle est uniquement due à l'absorption de lumière par le composé lui-même. La cycloxydime, quant à elle, a été utilisée pour sonder les phototransformations sensibilisées sur cire ou dans la cire. Dans le domaine des réactions photosensibilisées, j'ai utilisé comme photosensibilisateurs les molécules produites directement par les plantes (les phytoalexines khellin et visnagin) ou des composés modèles de cette classe de molécules naturelles (la phénalénone).



chlorothalonil



cycloxydime

Le manuscrit comporte plusieurs chapitres :

- l'étude bibliographique présente l'état de l'art relatif à la photochimie des pesticides sur les végétaux ;
- la partie expérimentale décrit l'ensemble des techniques utilisées et les différents protocoles expérimentaux mis en place (chapitre III) ;
- une troisième partie présente les résultats obtenus sur la phototransformation du chlorothalonil. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal Env. Sci. Technol. ;
- une quatrième partie (chapitre IV à VIII) est consacrée aux réactions photosensibilisées. Elle décrit les propriétés de différents photosensibilisateurs en solution ou inclus dans la cire et la réactivité des sondes chimiques utilisées, principalement la cycloxydime ;
- enfin un résumé-conclusion rassemble les principaux résultats obtenus au cours de ce travail.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Devenir des pesticides après leur pulvérisation

Au moment de la pulvérisation des pesticides sur les cultures, il y a des pertes importantes de produits car le pesticide se répartit inévitablement entre la plante-cible, c'est-à-dire la mauvaise herbe à éliminer, et la plante non-cible, c'est-à-dire la plante de culture dans le cas des traitements herbicides, le sol et l'atmosphère. Dans le cas des traitements fongicides et insecticides, toutes les plantes sont ciblées. Les gouttelettes ou les vapeurs de pesticides sont en partie dispersées en dehors de la zone visée. La vitesse du vent et la taille des gouttelettes influencent bien sûr cette dérive. Par ailleurs, une certaine quantité de pesticide est perdue en tombant au sol et n'est pas interceptée par la plante. Le pourcentage d'interception par la végétation dépend du stade de développement des plantes, du type de culture et de leur densité. Par exemple dans le cas du maïs, l'interception varie entre 0% avant levée et 75% au stade de floraison. Enfin les caractéristiques physico-chimiques du produit pulvérisé et la nature de sa formulation sont aussi des paramètres importants¹.

Dans le cas des traitements post-levée, le pesticide commence son action juste après dépôt sur la plante. Durant cette première étape, la substance active qui a une cible à atteindre et une fonction à remplir doit être préservée pour conserver ses propriétés. Mais une fois que la molécule a rempli sa tâche, elle est considérée comme polluante. De même, toutes les molécules qui se retrouvent loin de la cible au moment du traitement sont déjà des polluants. Il existe une littérature assez abondante sur le devenir des pesticides dans l'environnement aquatique car c'est le milieu récepteur final de toutes les pollutions. Le devenir de ces composés à la surface du sol est déjà beaucoup moins documenté. Les études sur plantes sont quant à elles assez rares. Cette étude bibliographique va montrer que seules certaines données cinétiques sont disponibles. Une des questions qui se pose est celle de la contribution de la photochimie dans le phénomène général de dissipation du pesticide après pulvérisation. Revenons à la description détaillée des différentes voies de dissipation auxquelles sont soumis les pesticides après application sur le végétal². Il s'agit de la volatilisation, le ruissellement, la pénétration foliaire, la biodégradation et la photodégradation (Figure I.1).

1.1 La volatilisation

Le phénomène de volatilisation après pulvérisation sur les cultures est l'une des principales sources de pesticides dans l'atmosphère³. Les vapeurs de pesticides s'élèvent au-dessus de la zone traitée pour être ensuite transportées par les courants d'air sur des distances plus ou moins grandes. La pression de vapeur est un paramètre pertinent pour décrire la volatilité des pesticides. Les autres facteurs impliqués dans le phénomène de volatilisation sont la vitesse du vent, la température, l'humidité relative, l'hydrophobicité de la molécule, la nature de la surface foliaire, la distribution du pesticide sur le feuillage et la technique d'application⁴.

1.2 Le ruissellement

Le ruissellement est provoqué par la pluie et la rosée qui solubilisent le composé resté en surface. La pluie peut affecter la structure et l'activité d'un dépôt par sa dilution, redistribution, son élimination et son extraction des tissus foliaires⁵.

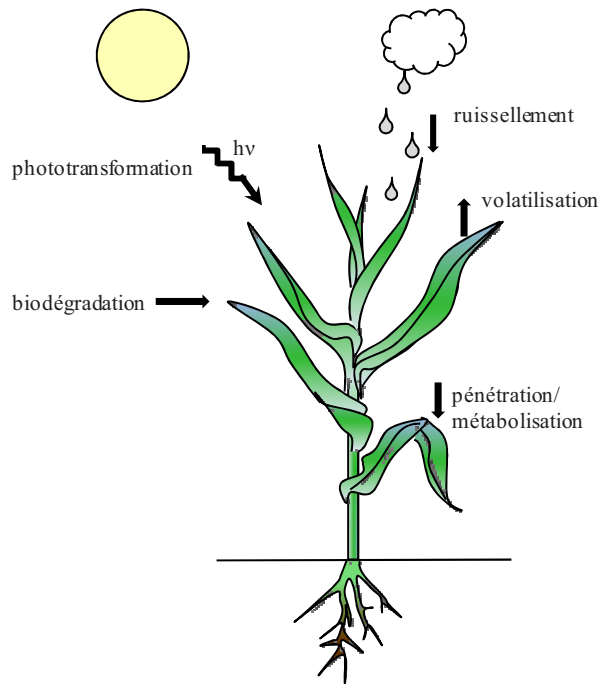


Figure I.1 : Principaux phénomènes de dissipation des pesticides intervenant après la pulvérisation sur les plantes.

1.3 Pénétration dans la plante et métabolisation

En fonction de leur mode d'action, les matières actives doivent pénétrer ou persister à la surface de la feuille. La cuticule qui est constituée de cire est une barrière hydrophobe que les principes actifs ont du mal à traverser (voir § 2). Les composés polaires y sont peu solubles et forment généralement des résidus solides après l'évaporation du solvant. On peut remédier à ce problème en utilisant des surfactants⁶ (voir § 3). Une fois entré dans les tissus foliaires, le composé peut être métabolisé ou s'accumuler dans les différentes parties de la plante.

1.4 La biodégradation

Dans les conditions environnementales, la surface de la feuille est recouverte de bactéries, de champignons et autres micro-organismes⁷. Ces organismes sont susceptibles d'avoir une influence sur la durée de vie des pesticides par des derniers facteurs dits « *biotiques* ». Il y a assez peu de travaux documentant cet aspect qui devrait être une voie très minoritaire de dégradation.

1.5 La photodégradation

La photodégradation des pesticides sur les plantes est une voie qui, à l'inverse de la biodégradation, peut être très destructive⁸. Elle est susceptible d'avoir lieu en surface ou à l'intérieur du mince film de cire épicuticulaire dans le cas où le composé a pu y pénétrer. On peut en effet considérer qu'une partie significative de la lumière solaire traverse cette première couche de cire et peut donc atteindre les composés qui s'y trouvent. Ajoutons à cela que les feuilles se tournent naturellement vers le soleil pour recueillir le maximum de photons, les pesticides qui se trouvent à la surface sont donc fortement exposés. Les photoproduits formés sont susceptibles à leur tour d'être volatilisés, de diffuser dans la plante ou de contaminer les milieux aquatiques et/ou les sols. Dans certains cas, les photoproduits détectés sont différents de ceux formés dans l'eau ou les sols⁹⁻¹¹. Ce point sera développé dans la suite de ce chapitre.

1.6 Contributions relatives de ces différentes voies de dissipation

Tous ces processus de dissipation sont en compétition et il est difficile d'évaluer la part de chacun puisque cette dernière dépend des conditions climatiques, de la nature de la molécule, de la formulation et de la plante. Il n'existe pas de paramètre physico-chimique que l'on puisse corrélérer à la photoréactivité des pesticides sur les plantes. Les études doivent être nécessairement systématiquement conduites. Les données obtenues en laboratoire peuvent contribuer à prédire les phénomènes de dissipation des pesticides. C'est ce qu'ont fait Leistra et al. en créant un modèle mathématique pour évaluer la dissipation du parathion et du chlorothalonil³. Examiner la photoréactivité des pesticides sur les surfaces foliaires permettra aussi d'écarter si nécessaire les pesticides les plus photolabiles ou de stabiliser les formulations^{12,13}.

2. La surface foliaire

Près de 80% de la surface terrestre est recouverte par la végétation. Sachant que la surface foliaire du végétal est généralement 6 à 14 fois plus importante que sa surface au sol, la végétation joue un rôle prépondérant dans le devenir des polluants atmosphériques¹⁴. La feuille offre une surface spécifique importante qui favorise tant l'interception des phytosanitaires pulvérisés en champ que celle des polluants organiques atmosphériques. Elle sert même d'indicateur de pollution de l'air¹⁵. Cette surface qui est aussi un collecteur de lumière solaire pour la photosynthèse est donc un support pour la phototransformation des micropolluants mais surtout des pesticides.

2.1 Structure de la cuticule

La **cuticule** est une membrane extracellulaire hydrophobe qui recouvre la surface des fruits et des plantes aériennes¹⁶. Elle constitue la première et principale barrière à la pénétration des pesticides appliqués sur les feuilles¹⁷. Son rôle est de protéger la plante de la dessiccation, de

l'attaque des insectes¹⁸ ou champignons¹⁹ et de filtrer le rayonnement UV²⁰. La cuticule est une multicouche composée de cire épicuticulaire, cire intracuticulaire, cutine et de pectine (cités dans l'ordre, en allant de l'extérieur vers l'intérieur de la feuille). L'épaisseur de cet ensemble varie de 0,1 à 10 μm ²¹.

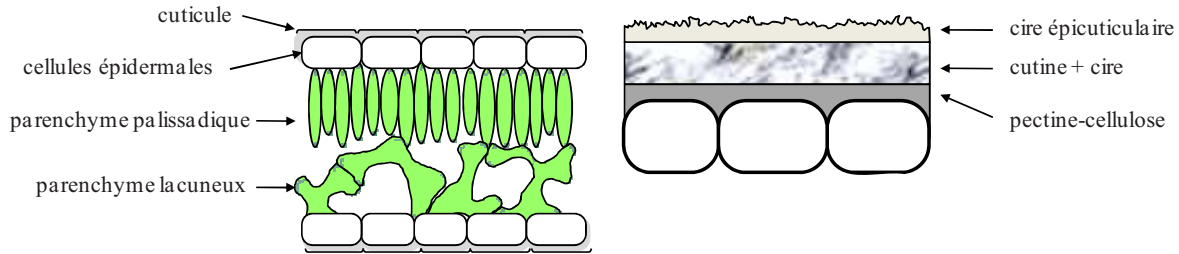


Figure I.2 : Coupe transversale de feuille et structure de sa cuticule.

La **cire épicuticulaire** est la couche la plus externe de la cuticule. Sa nature lipophile lui permet de contrôler la transpiration de la feuille^{17,22}. Sans la cire, la perméabilité de la feuille à l'eau serait 10 à 1300 fois plus importante²³. La cire épicuticulaire, synthétisée par les cellules épidermales²⁴, est un mélange de longues chaînes aliphatiques de 20 à 40 carbones ayant des fonctionnalités alcool, cétone, acide, aldéhyde et ester. Ces cires peuvent être amorphes ou cristallisées sous forme d'aiguilles, de tubes et de plaques¹⁶. La composition, la quantité, le taux de cristallinité et la forme des cristaux de la cire produite sont interdépendants²⁵. L'ontogénie et les facteurs environnementaux, tels que l'intensité lumineuse, la température et le taux d'humidité influencent la composition et l'épaisseur de la cire produite^{16,21,26}. Ces derniers facteurs influencent plus la quantité que la qualité de la cire : la sécheresse et une lumière très intense augmentent la production de cire¹⁶.

La **cutine** est un polymère résultant de l'estérification de longues chaînes hydroxy et hydroxy-époxy d'acides gras entre elles, réaction qui conduit à un réseau rigide tridimensionnel^{27,28}. La **cellulose et la pectine** lient la cuticule aux parois des cellules sous-jacentes²⁷. La cuticule peut aussi contenir des composés minoritaires comme les *terpénoïdes* et les composés phénoliques²⁹. Les poils appelés trichomes et les glandes sécrétrices d'huile présents sur la feuille font aussi partie du système de défense de la plante²².

Après pulvérisation, les pesticides se retrouvent à la surface de la cire épicuticulaire puisque c'est la couche la plus externe de la feuille. Sa composition essentiellement formée d'un mélange d'alcanes peut être dans un premier temps assimilée à la cire de paraffine. Parce que la cuticule est de nature lipophile, elle favorise la sorption des composés hydrophobes. Ces derniers étant plus « solubles » dans la cire cuticulaire que les composés hydrophiles, ils peuvent y diffuser plus facilement. Cependant, les agents de formulations modifient ces comportements et peuvent aider à la diffusion d'une substance active polaire dans la cire (voir § 3).

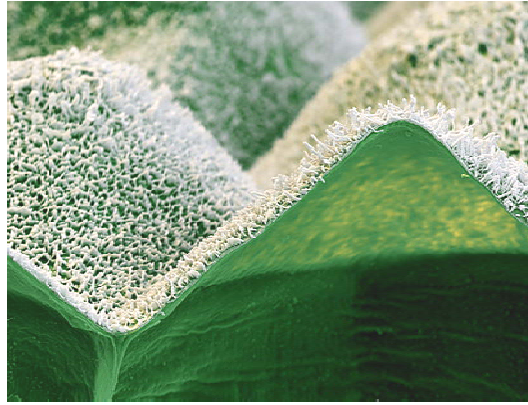


Figure I.3 : Cire épicuticulaire sur feuille de Taro³⁰.

2.2 Métabolites secondaires des plantes

La barrière cuticulaire ne suffit pas toujours à protéger les plantes. Celles-ci possèdent néanmoins des mécanismes sophistiqués pour se défendre des pathogènes ou des altérations causées par les conditions environnementales : les protéines de défense et les métabolites secondaires antimicrobiens. Ces métabolites secondaires peuvent être de deux types : les **phytoalexines** et les **phytoanticipines**^{31,32}. Les phytoalexines (du grec ; *phyto*-plante, *alexin*-défense) désignent les métabolites secondaires absents des tissus sains ou présents en traces, s'accumulant en quantités significatives en réponse à une activité fongique ou bactérienne. Les phytoanticipines désignent les métabolites antifongiques déjà présents. Ces métabolites sont en général de faible masse moléculaire (< 1000 Da) ce qui exclut les peptides et protéines antifongiques. Les phytoalexines ne sont pas uniquement produites suite à l'infection d'un pathogène mais peuvent aussi résulter de divers facteurs de stress non-biologiques dit *abiotiques* comme l'exposition aux UV, aux métaux lourds (ex : sels de cuivre ou de mercure) ou encore aux surfactants. Leur synthèse se fait rapidement, quelques heures après l'attaque et est localisée autour du site infecté. Ce mécanisme de défense est économique pour la plante qui synthétise le métabolite en puisant dans ses ressources énergétiques uniquement en cas de nécessité et de manière locale^{31,33}. Enfin, un même composé peut être phytoalexine chez une espèce et phytoanticipine chez une autre³³.

Pour renforcer l'efficacité de ces composés, les plantes utilisent l'énergie solaire. Les **phototoxines** sont des métabolites secondaires qui interviennent dans les réactions biologiques sous l'effet de la lumière solaire : ce sont des **photosensibilisateurs**. Certaines phytoanticipines ou phytoalexines font partie de cette catégorie de molécules. Parmi les familles de phototoxines les plus courantes on peut citer les furanocoumarins, les thiophènes et les quinones³¹. La présence des phototoxines induit des réactions dites photosensibilisées. Par conséquent il existe deux voies majeures de phototransformation des pesticides sur le végétal : la **photodégradation directe** où la lumière solaire est absorbée par le pesticide et la **photodégradation sensibilisée** où l'énergie solaire est absorbée par le sensibilisateur qui provoque la dégradation du pesticide.

Théoriquement, n'importe quel organe de la plante soumis aux attaques de pathogènes peut produire des phytoalexines³⁴. La localisation des phytoalexines au sein de la plante peut être simple lorsque celles-ci sont colorées. Ainsi Nicholson et al. ont montré par microscopie optique que les phytoalexines de sorgho s'accumulent dans les inclusions des cellules épidermales après infection fongique³⁵. Lorsque les inclusions éclatent, elles libèrent leur contenu dans la cellule et les phytoalexines peuvent ensuite migrer vers le pathogène et le tuer.

3. Formulations et agents d'étalement

Les pesticides sont toujours commercialisés formulés. Ils sont disponibles sous forme de poudre ou de granulés qui sont répandus sec (D, poussière ; G, granulé) ou sous forme liquide à diluer dans l'eau (EC, concentré émulsifiable; SP, poudre soluble, etc.). Toutes ces formulations contiennent une ou plusieurs substances actives auxquelles sont attribuées les effets du pesticide ainsi que des agents de formulation qui améliorent leurs propriétés physiques.

Les surfactants constituent un groupe important d'agents de formulations liquides. Ils abaissent la tension superficielle de l'eau permettant ainsi l'étalement de la gouttelette sur la feuille³⁶. Ils régulent aussi la diffusion des molécules peu lipophiles à travers la cuticule. Parce que la cuticule est composée de cires, elle favorise la sorption des substances actives les plus hydrophobes. En augmentant la fluidité des cires cuticulaires, les surfactants facilitent la mobilité du soluté dans celles-ci³⁶. Notons que l'absorption du composé par la plante n'est pas toujours requise. C'est pourquoi les additifs de formulation doivent être sélectionnés en fonction du mode d'action du pesticide. Un pesticide systémique doit rapidement diffuser dans toute la plante tandis qu'un pesticide de contact comme le chlorothalonil doit rester disponible à la surface de la feuille pour être accessible au pathogène.

Contrairement aux ingrédients actifs, les agents de formulation qui entrent dans la composition du produit commercialisé ne sont pas inscrits sur l'étiquette. Pour cette raison, il reste difficile d'évaluer la part de chacun des additifs sur la phototransformation de la substance active. Les additifs couramment utilisés jusqu'en 2005 étaient les alkylphénol éthoxylés comme le nonylphénol-9EO (voir Figure I.4). En raison de leur toxicité ils ont été remplacés par des polyoxydes d'éthylène, alcools éthoxylates ou des esters de polyéthylène glycol³⁷.

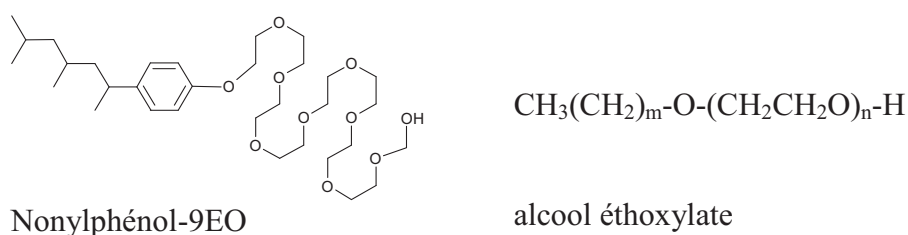


Figure I.4: Exemples de surfactants utilisés dans les formulations de pesticides.

Les formulations contiennent parfois des solvants tels que le toluène ou le xylène pour stabiliser la molécule et des colorants pour augmenter la précision de l'application. On peut également citer quelques exemples d'additifs de formulations autorisés par l'Agence de Réglementation de Lutte Antiparasitaire du Canada : des dérivés de phtalate ou d'éthylène glycol, des silicates comme la trémolite et l'amiante, du kérosène, des huiles de lubrification usées et des distillats de pétrole³⁸. Enfin, des huiles végétales ou minérales fournies en complément peuvent être ajoutées par l'utilisateur dans le mélange à pulvériser. Ces agents agissent encore sur les cires cuticulaires en les ramollissant³⁷.

4. Phototransformation des pesticides à la surface des feuilles

La photochimie concerne les processus chimiques dus à l'absorption de lumière. Elle est possible dans les compartiments terrestres (eaux de surface, sol, végétation). Ceux-ci sont atteints par le rayonnement de longueur d'onde supérieure à 290-295 nm du spectre solaire. Les autres sont en effet filtrés par l'atmosphère en quasi-totalité. Les réactions photochimiques peuvent être dues à l'absorption de lumière par le composé d'intérêt, on parle alors souvent de « **phototransformation directe** » ou à l'absorption de lumière par d'autres molécules. Dans ce dernier cas la réaction photochimique est dite « **photoinduite** » ; le composé d'intérêt est transformé après avoir réagi avec les états excités ou les radicaux issus du photoinducteur. Les réactions « **photosensibilisées** » sont des réactions photoinduites au cours desquelles le sensibilisateur est régénéré. Dans tous les compartiments terrestres ces deux types de réactions, directes et induites, peuvent avoir lieu. Leur importance relative est fonction de la photodegradabilité du composé lui-même, de la présence ou non de photosensibilisateurs ou photoinducteurs potentiels, de sa sensibilité aux espèces réactives du milieu et des conditions existantes. Ce domaine d'étude est particulièrement riche et fait l'objet d'un grand nombre de travaux. L'essentiel des publications concerne le milieu aquatique. Pourtant, les pesticides déposés sur les plantes sont susceptibles d'être soumis à de la phototransformation directe et sensibilisée car, comme cela a été présenté dans le paragraphe précédent, un certain nombre de molécules produites par les plantes sont réactives photochimiquement et peuvent induire des réactions.

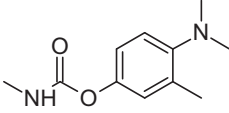
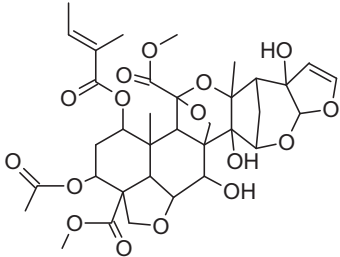
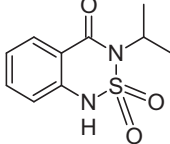
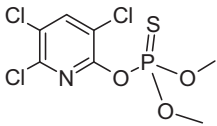
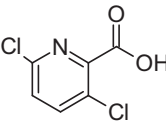
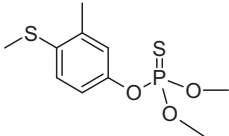
Etudier la phototransformation des pesticides directement sur les plantes est assez lourd à mettre en œuvre et la plupart des expériences sont réalisées sur des systèmes simplifiés. Le modèle le plus simple pour tenter de reproduire les réactions à la surface des feuilles est la plaque de verre, cependant cette dernière offre un environnement chimique très différent de celui d'une cuticule de sorte que les résultats obtenus peuvent s'écarter de la réalité. Certains auteurs ont préféré travailler directement dans des solvants organiques présentant une structure chimique proche de celle des constituants des cires comme l'oléate de méthyle ou le 12-hydroxystéarate^{39,40}. Même si les molécules dont est étudiée la photochimie sont plus mobiles dans les solvants organiques que sur les cires des feuilles ces systèmes permettent d'acquérir de précieuses informations. L'alternative consiste à utiliser comme support des cires épicuticulaires extraites de fruits⁴¹⁻⁴³, ou des cuticules de feuilles ou de fruits⁴⁴. Tous ces

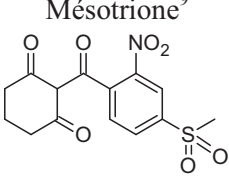
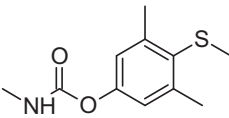
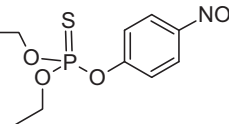
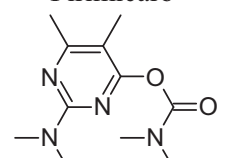
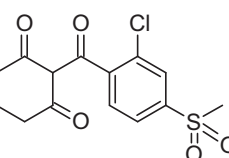
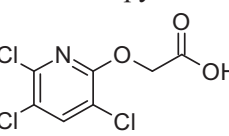
cas sont rapportés dans la littérature. Cependant aucune comparaison systématique de ces différents systèmes n'est présentée.

Le tableau I.1 rassemble des données de la littérature sur les durées de demi-vie à la lumière de quelques pesticides déposés sur cire ou cuticule. D'après ces données le phénomène de phototransformation est très rapide pour certains pesticides. Plusieurs composés présentent des durées de demi-vie très courtes, inférieures à 5 h. Il s'agit de l'aminocarb, du chlorpyrifos-méthyle, du fenthion, du pyrimicarb et la sulcotrione. D'autres sont beaucoup plus longues comme pour le fenthion formulé, le méthiocarb ou le pirimicarb sur feuille. Les vitesses de photodégradation dépendent d'un certain nombre de paramètres : la capacité de la molécule à absorber les photons, sa mobilité dans la cire, la nature de la surface, l'étalement de la molécule et donc aussi de la méthode dépôt et de la présence ou non de sensibilisateur.

A priori toutes ces molécules absorbent jusqu'à 290 - 300 nm et sont donc susceptibles de se phototransformer. L'influence des agents de formulation est variable. Leur effet sur la phototransformation des pesticides a été examiné dans des études antérieures menées au sein de notre laboratoire : les agents de formulation n'ont pas ou peu d'effet dans le cas de la bentazone et du chlorypyralid, en revanche ils ont un effet accélérateur dans le cas de la mésotrione et de la sulcotrione. D'une part, on peut s'attendre à ce qu'ils améliorent l'étalement de la molécule et donc favorisent l'absorption de photons ; d'autre part ils peuvent aider à la pénétration du pesticide dans la cire où il sera au contraire protégé du rayonnement solaire. Compte tenu de ces deux effets antagonistes, le résultat dépend étroitement des conditions expérimentales et du mode de récupération de la matière active. Il est donc délicat de généraliser. Enfin, certaines formulations contiennent spécifiquement des agents photoprotecteurs qui vont ralentir la photodégradation.

Tableau I.1: Données bibliographiques sur la photodégradation des pesticides sur cire.

Matière active ^{référence}	Support d'étude	Conditions d'irradiation	Temps de demi-vie ($t_{1/2}$) /h
Aminocarb ⁸ 	Cire de nectarine	Lumière polychromatique, $\lambda > 290$ nm	1
	Feuille de haricot vert	Lumière solaire	4
Azadirachtin ¹² 	Cire de paraffine	Lumière polychromatique, $\lambda > 290$ nm	16
Bentazone ¹² 	Cire de carnauba		20
Bentazone formulée ¹²	Cire de carnauba		30
Chlorpyrifos-méthyl ⁴⁵ 	Cire de fruit	Lumière polychromatique, $\lambda > 290$ nm	0,43-1,4
Clopyralid ¹² 	Cire de carnauba	suntest	26
Clopyralid formulé ¹²	Cire de carnauba	suntest	30
Fenthion ⁸ 	Cire de nectarine	Lumière polychromatique, $\lambda > 290$ nm	3,4
	Cire de fruit	Lumière solaire	2,4-11,9
Fenthion formulé ⁸	Ecorce d'orange	Lumière solaire	94-115
	Feuille de maïs	Lumière solaire	24

Matière active ^{référence}	Support d'étude	Conditions d'irradiation	Temps de demi-vie (t _{1/2})/h
Mésotrione ⁹ 	Film de paraffine	Lumière polychromatique, $\lambda > 290$ nm	8
Mésotrione ⁹	Cire de carnauba		6,41
Mésotrione formulée ⁹	Cire de carnauba		0,77
Mésotrione formulée ⁹	feuille		2,5
Méthiocarb ⁸ 	Cire de nectarine	Lumière polychromatique, $\lambda > 290$ nm	7
	Feuille de haricot		>72
Parathion ⁸ 	Cuticule de fruit	Lumière polychromatique, max 315 nm	2,1-13,5
Parathion formulé ⁸	Pois	Lumière polychromatique, $\lambda > 290$ nm	~24
Pirimicarb ⁸ 	Cire de nectarine	Lumière polychromatique, $\lambda > 290$ nm	3,7
	Cire de fruit	Lumière solaire	0,25-5,5
Pirimicarb formulé ⁸	Laitue	Lumière solaire	48
Sulcotrione ¹⁰ 	Cire de carnauba	Lumière polychromatique, $\lambda > 290$ nm	3,15
Sulcotrione formulée ¹⁰	Cire de carnauba		1,3
Triclopyr ⁴⁶ 	Cire de carnauba		75

Très peu de travaux ont cherché à évaluer l'importance relative des voies de phototransformation directe et sensibilisée. L'existence de réactions sensibilisées a été démontrée dans certains cas. Ainsi le 2,4-D qui n'absorbe pas au-delà de 290 nm, se phototransforme sur les plantes de maïs ce qui rend vraisemblable l'existence de processus de sensibilisation⁴⁷. En présence de roténone, le dinoseb et le dinobuton se photodécomposent

beaucoup plus vite qu'en son absence montrant là aussi l'existence de réactions sensibilisées⁴⁸.

Rares sont les publications qui traitent de la photodégradation des produits phytosanitaires de manière approfondie. Parmi les molécules examinées de manière complète jusqu'à présent, on peut citer la mésotrione, la sulcotrione, la bentazone, le clopyralid et le triclopyr. Ces composés ont été étudiés précédemment par notre laboratoire. Les résultats obtenus pour ces substances méritent notre attention.

La **mésotrione** est un herbicide tricétonique. Dans l'eau et dans le sol, sa durée de demi-vie ($t_{1/2}$) est de 86 à 96 jours et de 29 jours respectivement⁴⁹. Pourtant, une étude récente indique que la constante de vitesse de photodégradation de la mésotrione pure est de $2,4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ sur modèle foliaire, ce qui correspond à un $t_{1/2}$ de 8h. Ce résultat montre que la photodégradation foliaire peut être une voie significative de dissipation des pesticides dans l'environnement⁹. Les auteurs ont analysé l'effet de la nature de la cire sur la cinétique de phototransformation. Sur cire de carnauba et cire extraite de maïs, la substance active pure a un $t_{1/2}$ de 7 h. De même, les cinétiques sur paraffine et feuille de maïs sont assez semblables dans les conditions d'étude choisies ce qui permet de valider la cire comme modèle de surface foliaire.

Dans le cas de cette molécule, la nature de la cire n'affecte pas grandement la cinétique. Par contre, la composition de la formulation semble avoir une incidence considérable. Bien que les spectres d'absorption de la substance active et de la formulation soient fort semblables, la vitesse de phototransformation de la mésotrione formulée est 8 fois plus rapide que celle de la molécule pure (le $t_{1/2}$ de la formulation est de 0,5 à 1,1 h)⁹.

Les compositions des formulations ne sont pas divulguées, cependant elles contiennent essentiellement des agents d'étalement. Ainsi, il a été démontré qu'en ajoutant un surfactant à la substance active, la vitesse est multipliée par quatre. L'accélération est plus de nature physique que chimique puisque la vitesse de dégradation se stabilise au-delà d'une certaine quantité de surfactant ajouté. Ceci correspond certainement à un étalement maximum de la substance active. Plus la molécule est étalée, plus elle absorbe de lumière et plus elle est soumise à la phototransformation⁵⁰.

Le schéma réactionnel pour la formation des photoproduits issus de la mésotrione irradiée sur cire de carnauba est illustré à la Figure I.5. Les photoproduits M2 et M3 sont propres à la photodégradation sur cire et n'ont pas été découvert auparavant dans la littérature, M2 étant le photoproduit majeur⁵¹.

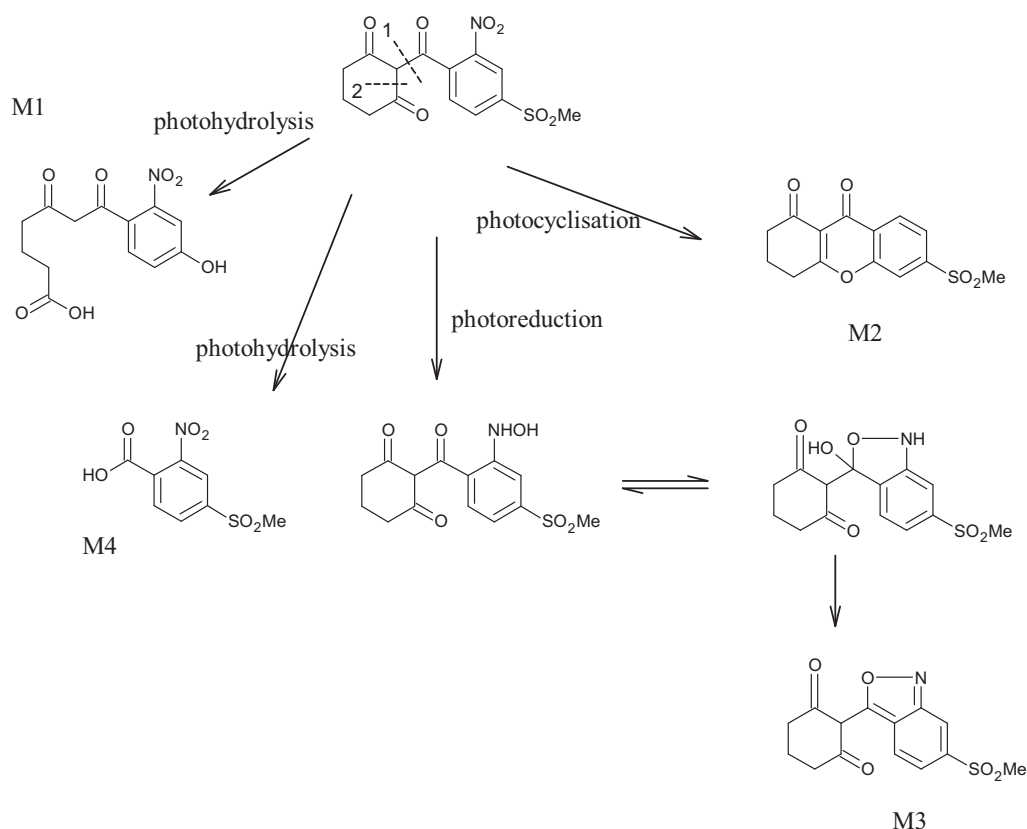


Figure I.5 : Structure des photoproduits issus de la mésotrione formés sur modèle foliaire⁵¹.

La **sulcotrione** est aussi un herbicide tricétonique. Sa durée de demi-vie de photolyse à pH 3,8 est de 8 h tandis que sa durée de demi-vie de photodégradation sur cire de carnauba et cire extraite de maïs est de 3 h et 1h30 respectivement¹⁰. Tout comme la mésotrione, la sulcotrione subit une cyclisation interne après irradiation sur cire (Figure I.6). Ce photoproduit issu de la cyclisation n'avait pas été mentionné auparavant dans la littérature. Il est issu de la photodégradation sur cire^{10,11}. Là-encore, la présence d'agents de formulation accroît nettement la vitesse de photodégradation^{52,53}.

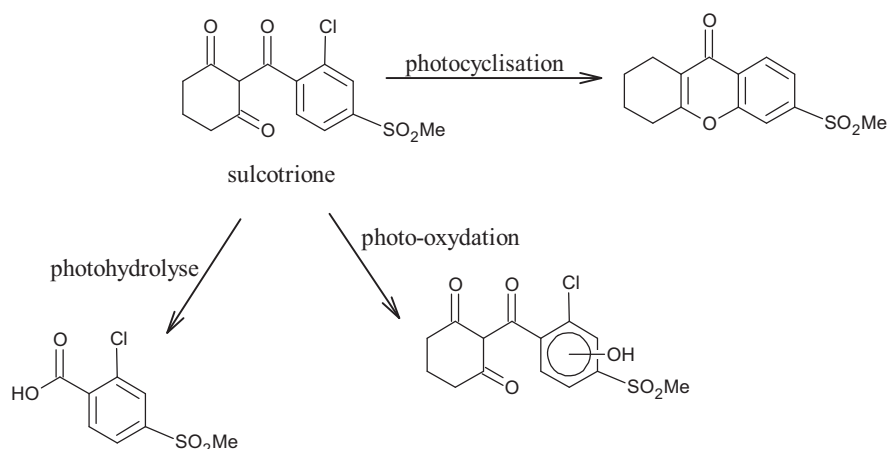


Figure I.6 : Photoproduits de la sulcotrione formés sur modèle foliaire.

Il a été montré pour la mésotrione et la sulcotrione que les cinétiques de phototransformation sont plus rapides pour les formulations que pour les molécules pures. Le **Bentazon** et le **Clopyralid** montrent l'effet opposé. La durée de demi-vie de photodégradation sur cire de carnauba est de 20 h pour le bentazon pur et de 30 h pour sa formulation. Les auteurs émettent l'hypothèse que l'adjuvant désactive le triplet du bentazon⁴⁶. Pour le Clopyralid, les cinétiques de disparition de la molécule pure et formulée sont très proches. La Figure I.7 présente les photoproduits du bentazon identifiés après irradiation sur cire. L'oxydation du cycle avec formation du produit hydroxylé est un photoproduit spécifiquement formé sur modèle foliaire. Les photoproduits du clopyralid et du triclopyr n'ont pas pu être identifiés du fait que ces molécules donnent probablement des fragments volatiles⁴⁶.

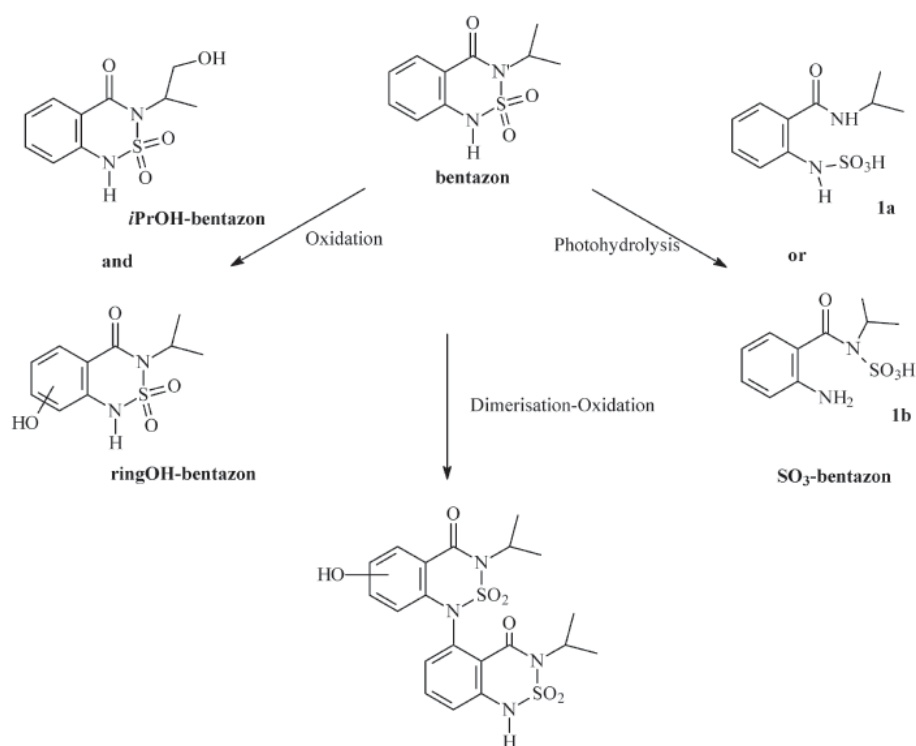


Figure I.7 : Photoproduits du bentazon formés sur cire de carnauba⁴⁶.

Le **clopyralid** est une molécule qui absorbe très peu dans le spectre solaire. Le spectre d'absorption de la molécule dans l'eau à pH 6,5 s'arrête à 300 nm or la longueur d'onde minimale du rayonnement solaire atteignant la surface terrestre est de l'ordre de 290-295 nm. Pourtant le clopyralid a un $t_{1/2}$ de 26 h sur film de cire ce qui est plus de 200 fois plus petit que dans l'eau. De plus sa photodégradation sur sol est aussi très lente. On peut donc conclure que la photodégradation sur surface foliaire est une voie majeure de dissipation du clopyralid dans l'environnement⁴⁶. Enfin, on peut citer l'exemple du **triclopyr** qui lui, au contraire, présente une vitesse de photolyse plus importante dans l'eau que sur cire⁴⁶.

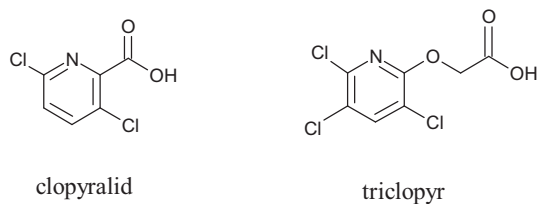


Figure I.8 : Structure chimique du clopyralid et du triclopyr.

Ces résultats indiquent que les cinétiques de photodégradation sont généralement plus rapides sur les modèles foliaires que sur les sols ou dans l'eau. Toutefois les études doivent être systématiques car il existe des exceptions (ex. triclopyr). On peut tirer les conclusions suivantes : même si une molécule absorbe très peu dans le spectre solaire, elle peut être photolabile (ex. clopyralid) - les vitesses de photodégradation des formulations sont souvent plus rapides que celles des molécules pures mais ce n'est pas toujours le cas (ex bentazon) - il existe des photoproduits spécifiques à la photodégradation sur modèle foliaire.

5. Mécanismes de phototransformation

Après absorption d'énergie lumineuse (Abs), le composé initialement à l'état fondamental S_0 passe dans un état excité singulet S_1 , S_2 , etc. Cet état très réactif est susceptible de réagir de différentes manières : par conversion interne ($S_2 \rightarrow S_1$), par désactivation radiative ou non radiative, par réaction chimique ou par transition inter-système pour conduire à un état triplet T_1 , T_2 , etc. Ce dernier peut à son tour se désactiver par phosphorescence ou par un processus non radiatif ou bien réagir. L'ensemble de ces processus est présenté Figure I.9.

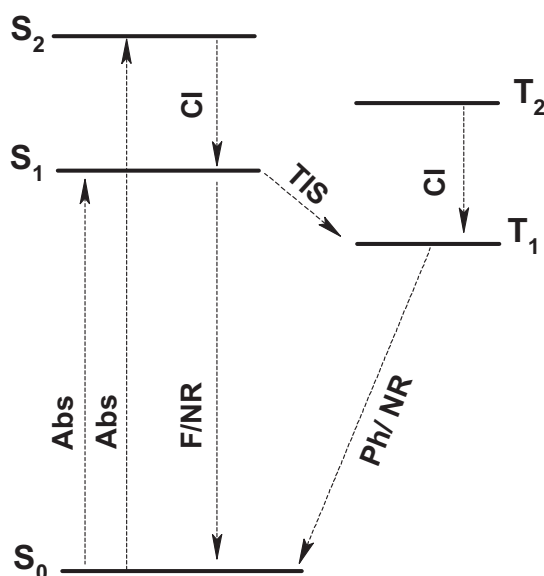


Figure I.9 : Processus photochimiques : Absorption (Abs), conversion interne (CI), transition intersystème (TIS), fluorescence (F), processus non radiatif (NR), phosphorescence (Ph).

La durée de vie des états excités dépend d'un grand nombre de facteurs comme l'environnement chimique ou la différence d'énergie entre les états. Le milieu solide favorise l'allongement de la durée de vie des états excités par rapport au milieu liquide en offrant un environnement rigide. Les principales différences entre réactions à l'état solide et réactions à l'état liquide tiennent à la faible mobilité des molécules en phase solide qui réduit la réactivité des états excités d'une façon générale.

Les réactions sensibilisées impliquent généralement l'état excité triplet qui a une durée de vie plus longue que l'état excité singulet et peut donc être capté par des molécules présentes dans la solution. Les **réactions d'oxydation photosensibilisées** sont de deux types : **le type I et le type II** ^{31,54}.

Dans les réactions de **type I**, le sensibilisateur (Sens) peut arracher un électron ou un atome H au substrat (RH) ce qui donne $\text{Sens}^{\cdot-} + \text{RH}^{\cdot+}$ ou $\text{SensH}^{\cdot} + \text{R}^{\cdot}$ respectivement. Si la réaction de transfert d'électron est suivie d'un arrachement de proton, elle donne également $\text{SensH}^{\cdot} + \text{R}^{\cdot}$. Le sensibilisateur pourrait aussi céder un électron au substrat pour former $\text{Sens}^{\cdot+} + \text{RH}^{\cdot-}$. Souvent, ces réactions d'oxydoréductions ne sont que partiellement efficaces car une partie des radicaux donnent lieu au transfert d'électron ou d'atome H inverse dans la cage de solvation, ce qui régénère les composés de départ à l'état fondamental.

Le sensibilisateur réagit avec le dioxygène à l'état fondamental, soit par transfert d'énergie ce qui conduit à la formation d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), soit se fait désactiver, soit cède un électron au dioxygène pour donner le radical anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Les réactions de **type II** font intervenir $^1\text{O}_2$ qui est une espèce diffusante. Dans les plantes, les réactions du type II sont propageables et celles du type I sont localisées autour du site infecté.

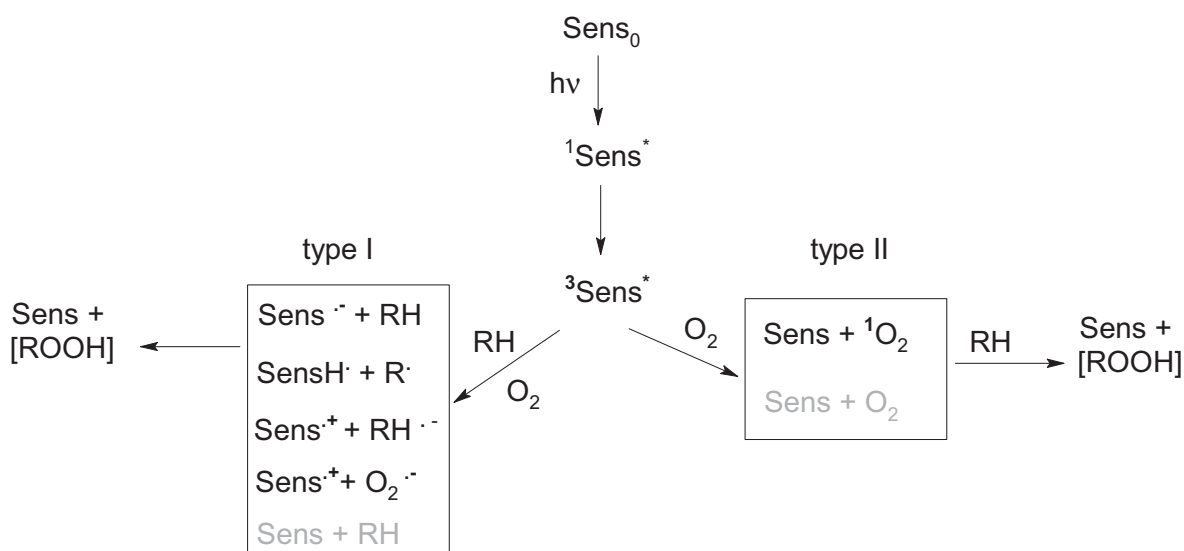


Figure I.10 : Mécanisme de photosensibilisation par les phototoxines.

La plupart des composés organiques sont singulets à l'état fondamental. Leur réactivité avec une espèce triplet est interdite par la règle de conservation de spin. L'oxygène a la

particularité d'être triplet à son niveau d'énergie fondamental et singulet à son premier état excité. Par conséquent, l'oxygène singulet peut réagir avec la plupart des composés organiques.

Cette espèce extrêmement toxique pour les systèmes biologiques peut former des peroxydes avec les structures insaturées et détruire ainsi l'ADN, les enzymes, les lipides membranaires et autres constituants cellulaires^{55,56}. Pour cette raison, l'oxygène singulet fait partie du système de défense de la plante. En effet, les phototoxines essentiellement présentes dans les cellules épidermales des plantes sont en contact avec l'oxygène atmosphérique. Ceci permet le transfert d'énergie entre la phototoxine excitée et l'oxygène atmosphérique ou présent dans la plante pour former l'oxygène singulet. La durée de vie de cette espèce est mille fois supérieure en phase gazeuse qu'en phase liquide (voir Tableau I.2) ce qui lui permet de parcourir de longues distances avant de se désactiver. **Par conséquent, il peut persister suffisamment longtemps pour réagir avec les pathogènes ou encore les substances actives déposées sur la surface foliaire.** Ainsi, Berenbaum et al. ont mis en évidence la présence d'oxygène singulet à la surface des plantes de *Zanthoxylum americanum* et de *Pastinaca sativa* connues pour produire des phototoxines. Les auteurs ont mesurés un flux de 4×10^{12} molécules d'oxygène singulet $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ qui est donc présent jusqu'à deux millimètres au-dessus de la surface foliaire⁵⁵.

Tableau I.2: Durée de vie de l'oxygène singulet dans divers milieux références⁵⁷⁻⁶⁰

milieu	τ (μs)	distance de diffusion (nm)
air	(59000 ± 6000)	$1-2 \times 10^6$
H ₂ O	$(4,0 \pm 0,2)$	
CH ₃ OH	$(9,5 \pm 0,4)$	
C ₆ H ₁₂	(23 ± 2)	
CH ₃ CN	(77 ± 3)	
CCl ₄	(770 ± 50)	
Cellules	$(3,0 \pm 0,3)$	$< 268 \text{ nm}$
polystyrène	(21 ± 2)	

Les espèces activées de l'oxygène (reactive oxygen species – ROS) : O_2^- , H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$ et $^1\text{O}_2$ font partie du système de lutte contre les pathogènes. Elles sont couramment générées au cours du métabolisme cellulaire et de nombreux systèmes de protection contre elles existent.

Références

1. Linders, J.; Mensink, H.; Stephenson, G.; Wauchope, D.; Racke, K. Foliar interception and retention values after pesticide application. A proposa for standardized values for environmental risk assessment. *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 2199-2218.
2. Bentson, K. P. Fate of xenobiotics on foliar pesticide deposits. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **1990**, *114*, 125-151.
3. Leistra, M.; Van Den Berg, F. Volatilization of Parathion and Chlorothalonil from a Potato Crop Simulated by the PEARL Model. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 2243-2248.
4. Bedos, C.; Rousseau-Djarbi, M.-F.; Loubet, B.; Durand, B.; Flura, D.; Briand, O.; Barrusio, E. Fungicide Volatilization Measurements: Inverse Modeling, Role of Vapor Pressure, and State of Foliar Residue. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 2522-2528.
5. Thacker, J. R. M.; Young, R. D. F. The effects of six adjuvants on the rainfastness of chlorpyrifos formulated as an emulsifiable concentrate. *Pest Manag. Sci.* **1999**, *55*, 198-200.
6. Baur, P. Surfactant effects on cuticular penetration of neutral polar compounds: dependence on humidity and temperature. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 753-761.
7. Müller, C.; Riederer, M. Plant surface properties in chemical ecology. *J. Chem. Ecol.* **2005**, *31*, 2621-2651.
8. Katagi, T. Photodegradation of pesticides on plant and soil surfaces. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, *182*, 1-195.
9. Lavieille, D.; Ter Halle, A.; Richard, C. Understanding mesotrione photochemistry when applied on leaves. *Environ. Chem.* **2008**, *5*, 420-425.
10. Ter Halle, A.; Drncova, D.; Richard, C. Phototransformation of the herbicide sulcotrione on maize cuticular wax. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 2989-2995.
11. Ter Halle, A.; Piquet, A.; Richard, C. An actual scenario that demonstrates sulcotrione photodegradation on maize leaves after spraying. *Environ. Chem.* **2007**, *4*, 256-259.
12. Eyheraguibel, B.; Richard, C.; Ledoigt, G.; Ter Halle, A. Photoprotection by plant extracts: e new ecological means to reduce pesticide photodegradation. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 9692-9696.
13. Eyheraguibel, B.; Richard, C.; Ledoigt, G.; Ter Halle, A. Inhibition of herbicide photodegradation by plant products. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 4868-4873.
14. Simonich, S. L.; Hites, R. A. Vegetation-atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* **1994**, *28*, 939-943.

15. Dolinová, J. I.; Klánová, J.; Kán, P.; Holoubek, I. Photodegradation of organic pollutants on the spruce needle wax surface under laboratory conditions. *Chemosphere* **2004**, *57*, 1399-1407.
16. Koch, K.; Ensikat, H.-J. The hydrophobic coatings of plant surfaces: Epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly. *Micron* **2008**, *39*, 759-772.
17. Santier, S.; Chamel, A. Reassessment of the role of cuticular waxes in the transfer of organic molecules through plant cuticles. *Plant Physiol. Bioch.* **1998**, *36*, 225-231.
18. Juniper, B. E. Waxes on plant surfaces and their interactions with insects. *Waxes: chemistry, molecular biology and functions*, Hamilton, R. J., Ed.; The oily press: Dundee, Scotland, **1995**, 157-174.
19. Jenks, M. A.; Joly, R. J.; Peters, P. J.; Rich, P.; Axtell, J. D.; Ashworth, E. N. Chemically induced cuticle mutation affecting epidermal conductance to water vapor and disease susceptibility in sorghum bicolor (L.) Moench.. *Plant Physiol.* **1994**, *105*, 1239-1245.
20. Pfündel, E. E.; Agati, G.; Cerovic, Z. G. Optical properties of plant surfaces. *Annual plant reviews. Biology of the plant cuticle.* **2007**, *23*.
21. Kirkwood, R. C. Recent developments in our understanding of the plant cuticle as a barrier to the foliar uptake of pesticides. *Pestic. Sci.* **1999**, *55*, 69-77.
22. *Biology of the plant cuticle*; Oxford, **2006**, *23*.
23. Riederer, M.; Schreiber, L. Waxes - the transport barriers of plant cuticles. In *Waxes: chemistry, molecular biology and functions*, Hamilton, R. J., Ed.; The oily press: Dundee, **1995**, 131-156.
24. Jenks, M. A.; Ashworth, E. N. Plant epicuticular waxes: function, production and genetics. *Horticultural reviews* **1999**, *23*, 1-68.
25. Beattie, G. A.; Marcell, L. M. Effect of alterations in cuticular wax biosynthesis on the physicochemical properties and topography of maize leaf surfaces. *Plant Cell Environ.* **2002**, *25*, 1-16.
26. Riederer, M.; Markstädter, C. Cuticular waxes: a critical assessment of current knowledge. *Plant Cuticles*, editors Kerstiens, G., BIOS scientific publishers, Oxford, **1996**, 189-200.
27. Holloway, P. J. The chemical constitution of plant cutins. *The plant cuticle*, Cutler, D. F., Alvin, K. L., editors Price, London, **1982**, 44-85.
28. Taiz, L.; Zeiger, E. Plant physiology. fourth ed.; Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, **2006**, 197-220.

29. Holloway, P. J. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. *The plant cuticle*, Cutler, D., Alvin, K. L., Price, C. E., Eds.; London, **1982**, 1-32.
30. <http://www.sciencephoto.com> , **2012**.
31. Flors, C.; Nonell, S. Light and singlet oxygen in plant defense against pathogens: phototoxique phenalenone phytoalexins. *Accounts Chem. Res.* **2006**, 39 (5), 293-300.
32. Van Etten, H. D.; Mansfield, J. W.; Bailey, J. A.; Farmer, E. E. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus "phytoanticipins". *Plant Cell* **1994**, 6, 1191-1192.
33. Grayer, R. J.; Kokubun, T. Plant fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* **2001**, 56, 253-263.
34. Dakora, F. D.; Philips, D. A. Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **1996**, 46, 1-20.
35. Nicholson, R.; Wood, K. V. Phytoalexins and secondary products, where are they and how can we measure them? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2001**, 59, 63-69.
36. Katagi, T. Surfactant effects on environmental behavior of pesticides. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2008**, 194, 71-177.
37. Hanzen, J. L. Adjuvant-terminology, classification and chemistry. *Weed Technol.* **2000**, 14, 773-784.
38. Liste des produits de formulation de l'ARLA (Agence de Réglementation de la Lutte Antiparasitaires).
http://publications.gc.ca/collections/collection_2010/arla-pmra/H114-22-2010-fra.pdf
39. Schwack, W. Photoinduced addition of pesticides to biomolecules. 2. Model reactions of DDT and methoxychlor with methyl oleate. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, 36, 645-648.
40. Schwack, W.; Andlauer, W.; Armbruster, W. Photochemistry of parathion in the plant cuticle environment: model reactions in the presence of 2-propanol and methyl 12-hydroxystearate. *Pest. Sci.* **1994**, 40, 279-284.
41. Cabras, P.; Angioni, A.; Garau, V. L.; Melis, M.; Pirisi, F. M.; Minelli, E. V. Effect of Epicuticular Waxes of Fruits on the Photodegradation of Fenthion. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 3681-3683.
42. Pirisi, F. M.; Angioni, A.; Cabizza, M.; Cabras, M.; Maccioni, E. Influence of Waxes on the Photolysis of Pirimicarb in the Solid Phase. *J. Agric. Food Chem* **1998**, 46, 762-765.
43. Pirisi, F. M.; Angioni, A.; Cabizza, M.; Cabras, P.; Cao, C. F. Photolysis of pesticides: influence of epicuticular waxes from *Persica laevis* DC on the photodegradation in the solid phase of aminocarb, methiocarb and fenthion. *Pest. Manag. Sci.* **2001**, 57, 522-526.

44. Schynowski, F.; Schwack, W. Photochemistry of parathion on plant surfaces: relationship between photodecomposition and Iodine number of the plant cuticule. *Chemosphere* **1996**, *33*, 2255-2262.
45. Riccio, R.; Trevisan, M.; Capri, E. Effect of surface waxes on the persistence of chlorpyrifos-methyl in apples, strawberries and grapefruits. *Food Addit. Contam.* **2006**, *23*, 683-692.
46. Eyheraguibel, B.; Ter Halle, A.; Richard, C. Photodegradation of Bentazon, Clopyralid, and Triclopyr on model leaves: importance of a systematic evaluation of pesticide photostability on crops. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1960-1966.
47. Venkatesh, R.; Harrison, S. K. Photolytic degradation of 2,4-D on Zea mays leaves. *Weed Sci.* **1999**, *47*, 262-269.
48. Bandal, S. K.; Casida, J. E. Metabolism and photoalteration of 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol (DNBP herbicide) and its isopropyl carbonate derivative (dinobuton acaricide). *J. Agri. Food Chem.* **1972**, *20*, 1235-1245.
49. International Organization for Standardization, G. ZA 1296, *ISO proposed name mesotrione, Directive 91/414/EEC.Draft SC*;10700; 99.
50. Lavieille, D.; Ter Halle, A.; Bussière, P. O.; Richard, C. Effect of a spreading adjuvant on mesotrione photolysis on wax films. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 9624-9628.
51. Ter Halle, A.; Lavieille, D.; Richard, C. The effect of mixing two herbicides mesotrione and nicosulfuron on their photochemical reactivity on cuticular wax film. *Chemosphere* **2010**, *79*, 482-487.
52. Lavieille, D.; Ter Halle, A.; Richard, C. Phototransformation of pesticides on plant leaves. Case of triketonic herbicides. Conference paper : Environmental fate and ecological effects of pesticides. Piacenza, Italy. **2007**, 160-167.
53. Ter Halle, A.; Wiszniowski, J.; Richard, C. Phototransformation of pesticides on plant leaves: the case of sulcotrione. *Comm. Agric. Appl. Biol. Sci.* **2007**, *72*, 45-52.
54. Greer, A. Christopher Foote's discovery of the role of singlet oxygen [1O_2 ($^1\Delta_g$)] in photosensitized oxidation reactions. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 797-804.
55. Berenbaum, M. R.; Larson, R. A. Flux of singlet oxygen from leaves of phototoxic plants. *Experientia* **1988**, *44*, 1030-1032.
56. Foot, C. S.; Valentine, J. S.; Greenberg, A.; Liebman, J. L. Properties and reactions of singlet dioxygen. *Active oxygen in chemistry*; Blackie Academic & Professional, London, **1995**, 104-140.
57. Midden, W. R.; Wang, S. Y. Singlet oxygen generation for solution kinetics: clean and simple. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4129-4135.

58. Skovsen, E.; Snyder, J. W.; Lambert, J. D. C.; Ogilby, P. R. Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell. *J. Phys. Chem. Lett. B* **2005**, 109, 8570-8573.
59. Scurlock, R. D.; Kristiansen, M.; Ogilby, P. R.; Taylor, V. L.; Clough, R. L. Singlet oxygen reactions in a glassy polystyrene matrix. *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, 60, 145-159.
60. Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1995**, 24, 663-1021.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

Tous les composés utilisés au cours de cette thèse ainsi que les appareillages et les techniques analytiques sont détaillées dans ce chapitre.

1. Produits chimiques utilisés, pureté et provenance

Les pesticides purs

Chlorothalonil, 99,3 % , Fluka
 α -cypermethrine, 99,8 % , Riedel de Haën
Cycloxydim, 97,6 % , Riedel de Haën
Epoxyconazole, 99,2 % , Riedel de Haën
Folpet, 99,9 % , Fluka
Mandipropamide, 98,8 % , Fluka
Mésotrione 99,9 % , Riedel de Haën
Propiconazole, 98,6 % , Riedel de Haën
Pyrimethanil, 99,9 % , Fluka
Thiophanate-méthyle, 99,3%, Fluka

Les pesticides formulés

Fongil FL, Phytoeurop, suspension concentrée à 500 g/l en chlorothalonil. Cette formulation a été aimablement fournie par le Centre d'études technique agricole de Limagne.

Stratos ultra, BASF agro S.A.S., concentré émulsifiable à 100 g/l en cycloxydime a été acheté par Pomarel Négoce à Etoile-sur-Rhône.

Les Additifs de formulation

Synperonic 10/6, Uniqema

Les phytoalexines

Khellin, 98 % , Fluka
Visnagin, 97 % , Aldrich

Les photosensibilisateurs et autres

Phénalénone, 97 % , Sigma
1,3-diphénylsiobenzofuran, 97 % , Sigma
Isoprène, 99 % , Sigma
4-nonylphénol, TCI
Anthracène, 99 % , Alfa Aesar
Cercosporin, Sigma
2,4,6 triméthylphénol, 99,9%, Fluka

Actinomètres

Para-nitroanisole, 97 %, Aldrich

Pyridine, Lancaster, 99 %

Ferrioxalate de potassium, synthétisé selon la procédure décrite par Clavert et Pitts¹

Citrate de sodium, 99%, Prolabo

1,10 phénanthroline, 99,5%, Merck

La cire commerciale

Cire de paraffine, mp 70-80°C, Sigma Aldrich

La séparation enzymatique

Macerozyme R-10, Duchefa biochemie

Citrate de sodium, 99%, Prolabo

Azoture de sodium, 99,5%, Sigma

La souche de champignon

Cercospora nicotianae, souche MUCL 38911, BCCM

Sabouraud agar en poudre, Difco

Dextrose, Sigma

2. Etudes en solution

Les études mécanistiques ont été réalisées dans des solvants organiques. Les cires cuticulaires sont des mélanges complexes contenant des alcanes à longues chaînes. Pour une première approche en solution, l'heptane est un solvant approprié. L'isopropanol a servi de co-solvant à l'heptane. Certains pesticides se sont avérés instables dans les solvants protiques, ils ont donc été étudiés dans l'acétonitrile.

2.1 Irradiations monochromatiques

Toutes les solutions ont été irradiées dans des cellules en quartz de 1 cm d'épaisseur équipées de bouchons en téflon. Les solutions désoxygénées ont été préparées en faisant barboter un flux d'argon pendant 10 minutes puis en fermant rapidement le tout avec un robinet pour empêcher une rentrée d'air. Les solvants et les concentrations des solutions sont décrites pour chaque expérience. Le dispositif d'irradiation monochromatique est constitué d'une lampe à arc mercure, modèle 66902 de puissance de 200W, équipée d'un monochromateur Schoeffel de marque Bausch and Lomb. Pour certaines cinétiques, il a été nécessaire de réduire le flux lumineux au moyen d'un filtre neutre modèle MTO s7108 qui transmet 25 % de l'intensité lumineuse. Pour établir une cinétique de photolyse, la solution a été prélevée à des temps d'irradiation différents et ensuite analysée par spectrométrie UV-Visible et HPLC-DAD. Les cellules désoxygénées ne peuvent être ouvertes qu'une fois au risque d'avoir une rentrée d'air dans la solution. Pour cette raison, seul un prélèvement est autorisé pour chaque temps d'irradiation.

2.2 Actinométrie

Une actinométrie au ferrioxalate a permis de mesurer le flux de photons monochromatique. La technique est détaillée dans la référence 1. Lorsque la solution de ferrioxalate est irradiée, il y a simultanément réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} et oxydation de l'ion oxalate. La solution de ferrioxalate est irradiée dans une cellule en quartz à la longueur d'onde souhaitée. Le 1,10 phénanthroline est ensuite ajouté pour former un complexe rouge avec les ions Fe^{2+} . Le flux de photons émis par la lampe peut alors être calculé en mesurant la différence d'absorbance entre la solution initiale et la solution irradiée. Bien que nous disposions d'une fibre optique, l'actinométrie chimique a été privilégiée. Par actinométrie chimique, toute la surface de la cellule est irradiée, alors que la fibre optique offre une surface de mesure réduite ce qui est contraignant si le flux de photons est inhomogène. Le flux de photons délivré par la lampe est de :

164×10^{15} photons $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ à 313 nm
 $3,91 \times 10^{14}$ photons $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ à 334 nm
 $5,86 \times 10^{15}$ photons $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ à 365 nm
 $2,50 \times 10^{15}$ photons $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ à 435 nm.

2.3 Analyse par photolyse laser flash

Les mécanismes réactionnels des composés ont été élucidés par photolyse laser flash. La technique consiste à exciter un composé au moyen d'un tir laser (durée 9 ns) et de mesurer l'absorption du transitoire généré à la fin du pulse. L'oxygène désactive certains transitoires ; il a donc été nécessaire de désoxygéner les solutions avec un flux d'argon pendant toute l'expérience. Le composé est excité à 266 ou 355 nm sur un laser nanoseconde Nd :YAG, de Quanta-Ray GCR130-1. L'appareil est couplé à un spectrophotomètre LKS.60 (Applied Photophysics) qui enregistre l'absorbance des transitoires générés pour une longueur d'onde. En balayant la longueur d'onde de mesure, la technique permet de tracer le spectre d'absorption des espèces transitoires. On peut aussi mesurer la constante de vitesse de désactivation des espèces générées. Cette constante de vitesse de désactivation dépend du milieu qui entoure le transitoire et de sa réactivité avec les molécules en solution. En exploitant cette propriété, on peut calculer la constante de vitesse de réactivité du transitoire avec le réactif (k_r) en mesurant la vitesse de relaxation de l'espèce pour différentes concentrations de réactif.

3. Dépôt et irradiation des pesticides à la surface des films de cire

Ce protocole suivi pour l'étude de la phototransformation des pesticides sur les films de cire a été reproduit à partir de la référence 2.

3.1 Réalisation des films épais

Les cires épicuticulaires sont des mélanges complexes ; cependant chez certains fruits ou légumes elles sont essentiellement constituées d'alcane^{3,4}. C'est le cas des cires de pommes qui contiennent près de 97 % d'alcane à 29 carbones. La paraffine est un mélange d'alcane contenant 20 à 40 atomes de carbone⁵. Les constituants des cires épicuticulaires peuvent donc être assimilés dans un premier temps à des cires de paraffine. Les expériences ont été menées sur des films de cire pour modéliser la surface foliaire. Ce modèle a été élaboré par Ter Halle et al.².

Les films de cire ont été préparés dans des cristallisoirs jetables en polyéthylène. Une quantité de 0,8 g de paraffine a été déposée dans chaque cristallisoir et chauffée à l'étuve à 85°C. Après fusion de la paraffine, la température de l'étuve est baissée progressivement pour avoir une surface de cire homogène. Après refroidissement, l'épaisseur du film formé est de 1 mm, ceci est calculé à partir de la densité de la paraffine ($d = 0,9 \text{ g cm}^{-3}$) (voir Figure II.1).

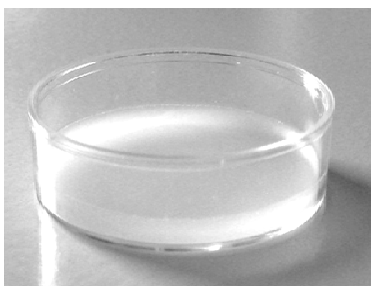


Figure II.1 : Film de paraffine de 1mm d'épaisseur

3.2 Traitement des films

3.2.1 Préparation des solutions

En raison de leur faible solubilité dans l'eau, les pesticides purs ont été dissous dans des solvants organiques. Le chlorothalonil a été préparé dans le méthanol. La cycloxydime étant à la fois peu soluble dans l'eau et instable dans les solvants protiques, elle a été solubilisée dans l'acétonitrile. Toutes les autres solutions de pesticides ont été préparées dans l'acétonitrile. Les formulations commerciales de Fongil FL et de Stratos ultra ont été diluées dans de l'eau purifiée par le dispositif Millipore milli Q (résistivité $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, $\text{COD} < 0,1 \text{ mg/l}$). En raison de la viscosité des formulations, le prélèvement ne peut être précis ni par pipetage ni par pesée. La concentration de la solution a donc été ajustée par analyse chromatographique en comparaison à la courbe d'étalonnage obtenue avec les molécules pures. Les spectres d'absorption des solutions ont été enregistrés avant l'application sur film de cire pour vérifier la stabilité au cours du temps et la présence d'éventuelles impuretés.

3.2.2 Application du pesticide

Le volume de la solution contenant la substance active est déterminé de manière à satisfaire les doses agricoles. La solution est déposée à l'aide d'une micropipette soit sous forme de gouttelettes de 1 à 2 μl ou un volume de 1,5 ml. Une fois la solution déposée sur le film de cire, le solvant est évaporé au moyen d'un ventilateur. Après évaporation du solvant, le dépôt formé est constitué du principe actif seul ou accompagné d'agent de formulation. Puisqu'à ce stade, nous étudions un dépôt solide, la concentration initiale de la solution n'importe plus⁶. Il est donc plus approprié d'exprimer la concentration en masse de substance active par unité de surface, appelé concentration surfacique (g/ha). Ceci permet aussi de comparer les expériences aux doses agricoles.

3.3 Irradiation des films

Les échantillons sont irradiés dans un simulateur de lumière solaire Suntest CPS (Atlas) équipé d'une lampe à arc xénon et de filtres supprimant les radiations de longueur d'onde inférieures à 290 nm (Figure II.2). C'est la source lumineuse dont la distribution spectrale est la plus proche de rayonnement solaire⁷. La puissance de l'appareil est ajustable de 0 à 765 Wm^{-2} . Nous avons choisi une puissance de 500 Wm^{-2} . Cette valeur correspond à l'intensité lumineuse moyenne pour l'ensoleillement terrestre à une latitude de 40°N dans les conditions estivales⁸. Le plateau sur lequel reposent les échantillons est maintenu à 16°C par un système de circulation d'eau. Un flux d'air refroidi la lampe de la Suntest. Au cours de l'irradiation, une plaque en quartz est posée sur les échantillons de manière à les stabiliser des perturbations dues au flux d'air.

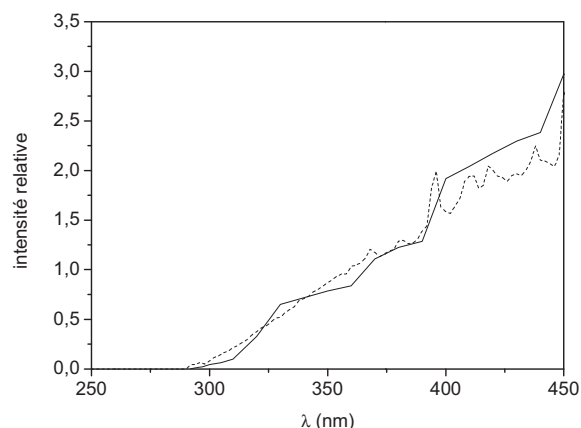


Figure II.2 : Suntest, distribution spectrale de sa lampe munie de filtre UV et IR à 765 Wm^{-2} (pointillé) et distribution spectrale des photons solaires arrivant à la surface de la terre (trait plein).

3.4 Actinométrie

L'évolution de la lampe de la Suntest a été suivie à la fois par actinométrie chimique et avec une fibre optique. Ceci a également permis de vérifier l'équivalence de toutes les positions envisageables dans l'enceinte d'irradiation. L'actinométrie chimique de l'irradiation

polychromatique a été réalisée au moyen d'une solution de para-nitroanisole (PNA) et de pyridine selon la méthode indiquée par Dulin et al. (ref⁹). La fibre optique qui a été employée est de marque Ocean Optics, modèle QE65000. La fibre est munie d'un filtre OFLV 200 nm et d'un détecteur S7031. Le logiciel Ocean Optics a permis d'intégrer le spectre d'émission de la lampe de 290 à 700 nm. Le flux de photons délivré par la lampe à 500 Wm^{-2} mesuré est de $1 \times 10^{17} \text{ photons cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

3.5 Rinçage des films

Afin d'établir une cinétique de disparition du pesticide au cours du temps, les échantillons irradiés ont été prélevés à des temps différents dans le réacteur Suntest. Les échantillons ont ensuite été rincés avec un solvant approprié pour désorber les molécules du film de cire. Les films de chlorothalonil ont été rincés avec du méthanol et les films avec les autres pesticides ont été rincés avec l'acétonitrile. Pour l'analyse des échantillons de Fongil FL, le solvant de rinçage a été remplacé par de l'eau ultra pure. Pour le Stratos, des mêmes taux de récupération sont obtenus en utilisant l'eau ou l'acétonitrile comme solvant de rinçage. Parce que la cycloxydime risque de s'hydrolyser en milieu aqueux, il a été préféré de travailler avec l'acétonitrile. Le rinçage se fait sous agitation manuelle pendant une minute. Cette méthode détruit l'échantillon. Afin de réduire les imprécisions de mesure, quatre répliquats ont été réalisés pour chaque temps d'irradiation. L'efficacité de récupération est de $95 \pm 5 \%$. Pour remédier aux erreurs dues à l'évaporation du solvant durant l'étape de rinçage, un standard externe a été ajouté au solvant. Le standard externe doit être un composé soluble dans le même solvant que le pesticide, son temps de rétention doit différer de la substance active et il ne doit pas former d'adduit avec le pesticide. Pour satisfaire à ces conditions, nous avons choisi le 2,4,6-triméthylphénol (TMP) comme standard externe. Ce standard externe a été utilisé par la suite uniquement pour les études sur la molécule de chlorothalonil au vu des faibles taux d'évaporation durant l'étape de rinçage. Les analyses ont été effectuées par HPLC-DAD.

3.6 Cinétique de dissipation

Pour décrire les cinétiques de dissipation du pesticide, le pourcentage de résidus de substance active à la surface du film a été reporté en fonction du temps. Afin d'estimer la vitesse de phototransformation du pesticide, les voies de volatilisation, pénétration et de thermolyse ont été évaluées. La volatilisation est mesurée pour des échantillons conservés à l'obscurité sur cristalliseur en verre ; la diffusion est mesurée pour des échantillons conservés à l'obscurité sur film de cire. Ces deux phénomènes sont négligeables pour les pesticides utilisés dans nos conditions expérimentales. Néanmoins, le premier point de la courbe (t_0) a été réalisé avec des échantillons conservés à l'obscurité et non la solution de dépôt. Le t_0 correspond donc à des échantillons non irradiés, préparés dans les mêmes conditions que les autres échantillons de l'expérience, rincés juste après évaporation du solvant.

4. Inclusion et irradiation des sensibilisateurs dans les films de cire

Pour certaines expériences, nous avons préparé des films contenant des sensibilisateurs. Cette partie concerne la préparation de ces films d'épaisseur d'environ 100 μm . Ces films sont beaucoup plus fins que ceux décrits au § 3. Ils servent uniquement à étudier les propriétés des sensibilisateurs présent dans les cellules épidermales et les cuticules des plantes. Les films ont été préparés à partir de cire de paraffine reproduisant l'environnement cuticulaire. Cette technique a permis de mesurer le rendement quantique de production d'oxygène singulet (Φ_{Δ}) des phytoalexines dans la cire.

4.1 Préparation des films

Parce que la paraffine est solide à température ambiante, il n'est pas possible de procéder à des dilutions en employant des fioles. Les dilutions ont été opérées en se basant sur la masse des échantillons et de la densité de la cire de paraffine ($d=0,9 \text{ g cm}^{-3}$). Dans un premier temps, des mélanges concentrés de cire contenant le ou les composés ont été préparés par pesée. Le mélange solide est ensuite chauffé à 90°C pour une homogénéisation complète puis laissé à refroidir. La stabilité thermique des composés ajoutés dans les films de cire a été vérifiée par spectroscopie infrarouge-ATR (Infrared-Attenuated Total Reflectance). Les spectres IR-ATR sont enregistrés en mode réflexion sur un spectrophotomètre Nicolet 380-FTIR équipé d'un ATR à pointe de diamant et traités avec le logiciel OMNIC. Les spectres obtenus résultent de la superposition de 32 scans. Aucune dégradation thermique n'a été notée pour les composés employés.

La dilution du mélange est obtenue en prélevant une masse appropriée du mélange concentré dans la paraffine. Différentes techniques ont été tentées pour obtenir des films de cire :

Le bar coating consiste à verser la cire solide sur une feuille de téflon déposée sur une plaque thermostatée et d'étaler ensuite la cire fondue au moyen d'une tige métallique qui permet de régler l'épaisseur du film. Ceci a été réalisé sur un bar coat de marque Erichsen Coatmaster et de modèle 509 MC. Parce que la température de la plaque diminue progressivement, la cire reprend sa forme originale et ne s'étale pas correctement. Les expériences avec cette technique ont été infructueuses pour les différentes températures testées.

Le spin-coating consiste à déposer une solution sur une plaque de verre en rotation. Il est possible de régler l'épaisseur du film en ajustant la viscosité de la solution et la vitesse de rotation de la plaque de verre. Le spincoat utilisé est de marque Cookson Electronics Equipment et de modèle G3P-8. La cire ne peut être fondue parce que le système n'est pas thermostaté. Pour obtenir une solution visqueuse, la cire est solubilisée dans du chloroforme. La technique n'a pas donné des résultats satisfaisants.

Finalement, les films ont été obtenus en versant environ 1 ml de cire fondue dans une boîte de 49 cm^2 dont le fond est recouvert de film aluminium. Après refroidissement, le film de cire

formé est détaché délicatement. Les films sont fractionnés en segments de 1×2 cm. Puis l'épaisseur de chaque fragment est mesurée avec un micromètre digital (M120 Cadar). La moyenne d'épaisseur des films obtenus avec cette technique est de 110 ± 15 μm . Rappelons que l'épaisseur de la cuticule des plantes varie de 0,1 à $10 \mu\text{m}^{(10)}$ et que l'épaisseur des cuticules de poivron séparés au cours de ce travail varie de 25 à 50 μm . Les films de cire de paraffine préparés sont donc plus épais que les cuticules foliaires mais les films plus fins sont extrêmement fragiles et difficiles à manipuler.



Figure II.3 : Films de cire de paraffine contenant des sensibilisateurs.

4.2 Irradiation et analyse des films

Chaque fragment de film est positionné sur un porte-échantillon en verre et irradié avec une source monochromatique présentée au paragraphe 2.1. Les irradiations monochromatiques sont souvent employées pour des études en phase liquide. Cette technique appliquée sur les films de cire permet de sélectionner la longueur d'onde d'excitation en fonction du sensibilisateur : les films contenant la phénalénone sont irradiés à 365 nm et ceux contenant la khellin ou le visnagin à 313 nm. Le rendement quantique de production d'oxygène singulet est calculé grâce au suivi du 1,3-diphénylisopbenzofurane (DPBF) qui sert de sonde fluorescente. L'appareil utilisé pour suivre l'évolution de la fluorescence à l'état solide est un spectrophotomètre de luminescence Perkin Elmer LS 55. Le DPBF est excité à 410 nm et l'émission est mesurée à 454 nm.

4.3 Spectre UV-Visible des films

Les spectres d'absorption des composés dans les films de cire sont enregistrés sur un spectrophotomètre Cary 3 (Varian) muni d'une sphère d'intégration DRA-CA-30I de marque Labsphere. L'appareil permet de mesurer le pourcentage de réflectance et de transmittance des films. Le sulfate de baryum est employé comme standard pour corriger la réflectance. L'absorbance des composés est calculé via la relation suivante :

$$A = \log\left(\frac{100 - R}{T}\right)$$

où R est le pourcentage de réflectance et T le pourcentage de lumière transmis dans le film contenant le composé.

5. Etude sur les cuticules isolées

La procédure de séparation enzymatique des cuticules a été adaptée de la référence 11. L'enzyme utilisée est composée de pectinase, cellulase et d'hémicellulase. Elle détruit la jonction entre la paroi des cellules épidermales des plantes et la cuticule. Cette méthode a été employée pour la séparation de cuticules de pomme Granny Smith, tomate, poivron vert, feuille de laurier rose et feuille d'olivier. La solution enzymatique est constituée de citrate de sodium à 20 mM, d'azoture de sodium à 1 mM et de macérozyme à 2 g/l. Les feuilles entières et les morceaux de fruits sont placés dans des béchers puis recouverts de solution enzymatique. Les béchers sont placés dans une étuve à 37°C. Les cuticules sont détachables au bout de 3 jours en moyenne pour les fruits et au bout de 7 à 8 jours pour les feuilles. Les propriétés des cuticules ont été analysées par spectroscopie IR-ATR.



Figure II.4 : Cuticule de tomate (à gauche) et de poivron (à droite)

6. Etude sur feuilles de tabac

La cycloxydime est un herbicide utilisé contre le chiendent, la folle avoine, le vulpin et autres graminés. Il est surtout employé sur les grandes cultures et les légumineuses mais aussi sur le tabac. Nous avons donc opté pour la plante de tabac comme plante modèle. Elle est aussi disponible au laboratoire PIAF du département de biologie. Par ailleurs le tabac nous a également permis d'expérimenter sur une espèce de champignon produisant une phototoxine (voir chapitre VIII). En effet, ce champignon induit la cercosporiose chez les plantes de tabac. Par conséquent, la plante de tabac présente l'avantage de réaliser deux types d'études en parallèle.

6.1 Application du pesticide

Les solutions de cycloxydime pure sont préparées dans l'acétonitrile et les solutions de Stratos (formulation de la cycloxydime) dans de l'eau ultra pure. Les feuilles de tabac sont coupées en disques de 3 cm de diamètre et placées sur une lame en verre. Les solutions de pesticides sont appliquées sous forme de gouttelettes de 1 à 2 μl à l'aide d'une micropipette. Le volume total appliqué sur la feuille n'excède pas 30 μl . Il n'est en effet pas possible d'appliquer un volume plus important, au risque que la solution déborde des disques foliaires. Les feuilles sont ensuite placées sous un système muni d'un ventilateur. La faible taille des gouttelettes assure un séchage rapide (20 min) quel que soit le solvant.

6.2 Irradiation des feuilles

Les feuilles sont irradiées au Suntest dans les mêmes conditions que les films de cire. La phototransformation de la cycloxydime sur film de cire s'est avérée rapide ; pour cette raison, il est possible d'établir la cinétique de phototransformation de la molécule sur les feuilles de tabac en seulement 2 h d'irradiation. Les feuilles irradiées pendant 2 h sont légèrement fanées mais restent manipulables.

6.3 Rinçage des feuilles

Des disques de feuilles vierges sont préalablement rincés avec un solvant pour vérifier s'il y a extraction de composés de la plante. Ces échantillons sont appelés « blanc-matrice ». Les disques de feuilles vierges sont plongés pendant 30 secondes dans 2 ml d'eau ultra pure et la solution est ensuite analysée par HPLC-DAD. La même procédure est répétée dans l'acétonitrile. Pour ces deux solvants, les chromatogrammes des échantillons blancs-matrices ne présentent pas de signal qui pourrait interférer avec ceux de la cycloxydime. Les feuilles contenant le pesticide sont rincées en versant deux fois 500 μl d'acétonitrile sur leurs surfaces. Les solutions de rinçage sont récupérées dans des cristallisoirs en verre et sont ensuite analysées par HPLC-DAD.

7. Culture du champignon *Cercospora nicotianae* et extraction de sa phototoxine

La *Cercospora* est une variété de champignon qui produit une phototoxine, la cercosporine. Cette toxine est un excellent sensibilisateur d'oxygène singulet^{12,13}. Pour cette raison, nous avons souhaité étudier l'effet de cette phototoxine sur la cycloxydime appliqué à la plante contaminée par la *Cercospora*. L'espèce de *Cercospora* qui contamine la plante de tabac est la *Cercospora nicotianae*.

7.1 Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture du champignon a été reproduit de la référence 14. Le milieu nutritif de la culture est la gélose dextrosée à la pomme de terre appelé PDA (Potato Dextrose Agar). Il est composé d'un litre de bouillon de pomme de terre, 20 g de dextrose et 20 g d'agar en poudre. Le mélange est stérilisé par autoclave à 100 kPa pendant 15 minutes. La solution est ensuite versée dans des boîtes de pétri de 9 cm de diamètre et se gélifie après quelques heures.

7.2 Culture du champignon

Les expériences ont été menées au laboratoire du SEESIB de l'Université Blaise Pascal qui est équipé de salles spécifiques pour la réalisation de culture fongique ou bactérienne. La contamination sur le PDA se fait sous une hotte à flux laminaire CYTAIR-125. A l'aide d'une tige métallique stérilisée, on prélève du mycélium de *Cercospora nicotianae* et on le dépose sur la boîte de PDA. La tige métallique est frictionnée sur toute la surface de la boîte pour assurer une contamination complète. Les boîtes sont placées pendant 10 jours dans un incubateur Multitron II (Infors) munie de lampes polychromatiques (300-500 nm). Les échantillons sont maintenus à 27°C.

7.3 Extraction et purification de la cercosporine

Pour s'assurer de la production de toxine dans le milieu de culture, il a été nécessaire de procéder à une extraction. La procédure d'extraction a été adaptée des références 15,16. Les milieux de cultures sur PDA incubés pendant 10 jours ont été sélectionnés. Le mycélium et la gélose ont été entièrement retirés et finement mixés. Le mélange est versé dans une fiole et recouvert d'eau. On procède à une extraction liquide-liquide en ajoutant de l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse se décolore tandis que l'acétate d'éthyle prend une coloration rouge due à la présence de la cercosporine. Cette phase est récupérée et l'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'une phase aqueuse incolore. A l'aide d'un évaporateur rotatif on évapore à sec l'extrait puis on ajoute quelques gouttes de chloroforme. La cercosporine est séparée par chromatographie sur couche mince sur une plaque de 20×20 cm revêtue de Silicagel de 2 mm d'épaisseur (60 F₂₅₄₊₃₆₆ ; Merck). Le mélange éluant est composé de 90 % de chloroforme et 10 % de méthanol. Après 15 minutes, la plaque est retirée et analysée au moyen d'une lampe UV à 254 nm. La cercosporine est un composé rouge et émet une fluorescence à 600 nm. Il

est donc facile de la localiser. Le facteur de rétention de la molécule obtenu avec ce mélange éluant est de 0,6. Le front de cercosporine est enlevé en grattant la plaque et transvasé dans une fiole contenant environ 10 ml de chloroforme. La solution est filtrée au moyen de filtre Minisart de pores de 20 μm (Sartorius stedim), évaporée à sec et reprise dans de l'acétonitrile. La solution est ensuite analysée par HPLC-DAD et par spectrométrie de masse.



Figure II.5 : Milieu de culture du *Cercospora nicotianae* et cercosporine extraite.

7.4 Contamination des feuilles

Pour mesurer l'effet de la photoxine sur les pesticides dans les conditions proches de la réalité, des plantes de tabac ont été contaminées. Nous n'avons malheureusement pas réussi à contaminer la plante entière malgré diverses tentatives. La contamination a été opérée sur des feuilles de tabac détachées en lavant préalablement chaque feuille rapidement à l'éthanol afin d'éliminer d'autres sources de champignon ou de bactérie. Les feuilles ont ensuite été déposées sur le milieu de culture avec la face inférieure en contact avec le mycélium ; elles ont également été incisées pour favoriser la contamination. La même opération a été réalisée en déposant la feuille sur le PDA pur. Les échantillons ont été conservés à température ambiante. Comme le montre la Figure II.6, seule la feuille déposée sur le mycélium présente des traces d'infection après 5 jours.

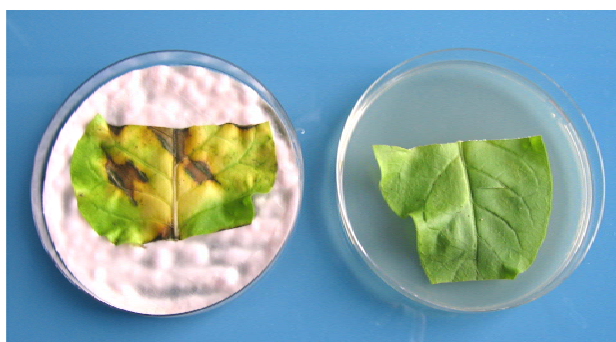


Figure II.6 : Feuille de tabac sur le mycélium de *Cercospora nicotinae* (à gauche) et feuille sur PDA pur (à droite) 5 jours après le dépôt.

8. Méthodes analytiques

8.1 Spectroscopie UV-Visible

Les spectres d'absorption des solutions ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Cary 3 (Varian) à double faisceau ayant une précision de $\pm 0,002$ en absorbance.

8.2 Chromatographie liquide

La chromatographie liquide a été employée pour suivre quantitativement l'évolution des pesticides au cours des irradiations et détecter les photoproduits. Elle a aussi servi pour ajuster la concentration des solutions de formulations.

Les deux HPLC suivantes ont servi à l'analyse du chlorothalonil :

-Une **HPLC Merck-Hitachi** équipée d'un passeur d'échantillon (AS-2000), d'une pompe (L-6200A) et d'un détecteur UV-Visible (L-4250) pour l'analyse en phase normale. La séparation des composés est réalisée sur une colonne Silica de modèle Sunfire (Waters), 250 mm \times 4,6 mm \times 5 μ m, avec un mélange éluant de 1% isopropanol et 99% n-heptane en mode isocratique. Le volume d'injection est de 50 μ l et le débit d'élution est de 1 ml min⁻¹. Le chlorothalonil est détecté à 232 nm.

- Une **HPLC Hewlett-Packard** de série **1050** équipée d'un passeur d'échantillon, d'un dégazeur, d'une pompe et d'une barrette de diode pour l'analyse en phase inverse. La séparation des composés est réalisée sur une colonne C18 de modèle Nucléodur (Macherey-Nagel), 150 mm \times 4,6 mm \times 5 μ m, avec un mélange éluant de 70% de méthanol et 30 % d'eau acidifiée à l'acide formique (0,5%) en mode isocratique. Le volume d'injection est de 25 μ l et le débit d'élution est de 1 ml min⁻¹. Le chlorothalonil est détecté à 232nm.

Tous les autres pesticides ont été analysés sur les HPLC suivantes :

-Une **HPLC Waters** équipée d'un passeur d'échantillon (Waters 717 plus), d'un dégazeur (Agilent 1100 series), d'une pompe (waters 515) et d'une barrette de diode (Waters 996). La séparation des composés est réalisée sur une colonne C18 de modèle Nucléodur (Macherey-Nagel), 150 mm \times 4,6 mm \times 5 μ m. Le volume d'injection est de 30 μ l et le débit d'élution est de 1ml min⁻¹. Les données sont traitées par le logiciel Millénium.

-Une **UPLC Acquity** Waters équipée d'un passeur d'échantillon thermostaté, d'un dégazeur, d'une pompe, d'une barrette de diode, d'un détecteur de fluorescence et d'un four à colonne thermostaté. La séparation des composés est réalisée sur une colonne C18 de modèle Nucléodur (Macherey- Nagel), 100 mm \times 2 mm \times 1,8 μ m. Le volume d'injection est de 6 μ l et le débit d'élution est de 0,5 ml min⁻¹. Les données sont traitées par le logiciel Empower.

Une pré-colonne de phase identique a systématiquement été ajoutée.

Les conditions chromatographiques utilisées sont listées au Tableau II.1.

Tableau II.1 : Techniques d'analyse des composés étudiés.

pesticide	système	élution	longueur d'onde de détection (nm)	temps de rétention (min)
Chlorothalonil	HPLC Merck-Hitachi	heptane-isopropanol 99%-1%	232	3,8
Chlorothalonil	HPLC 1050	MeOH-eau acide 70%-30%	232	7,5
Cycloxydime	HPLC Waters	gradient 1	280	16,5
Cycloxydime	UPLC Acquity	gradient 2	280	6,4
Khellin	HPLC Waters	gradient 1	280	5,7
Visnagin	HPLC Waters	gradient 1	280	6,2
Cercosporin	UPLC Acquity	gradient 2	280	3,6

Gradient 1 :

La composition de la phase mobile initiale est de 50% d'eau acidifiée (0,05% d'acide formique) et de 50% d'acétonitrile et est maintenue pendant 3 minutes. Le pourcentage d'acétonitrile est augmenté linéairement à 80% pendant 9 minutes et ensuite maintenu constant pendant 6 minutes. Le mélange éluant est à nouveau amené à sa composition initiale en 3 min et maintenu pendant 3 minutes.

Gradient 2 :

La composition de la phase mobile initiale est de 60% d'eau acidifiée (0,05% d'acide formique) et de 40% d'acétonitrile et est maintenue pendant 2 minutes. Le pourcentage d'acétonitrile est augmenté linéairement à 60% pendant 2 minutes et ensuite maintenu constant pendant 6 minutes. Le mélange éluant est à nouveau amené à sa composition initiale en 2 min.

Une courbe d'étalonnage a été tracée avec le principe actif pur dans la gamme de concentration étudiée avec la méthode décrite dans le tableau II.1 pour connaître le domaine de linéarité, la limite de quantification et de détection (Tableau II.2). La limite de détection correspond à un rapport signal sur bruit supérieur à 3 et la limite de quantification à un rapport supérieur à 10. La courbe d'étalonnage a aussi permis d'ajuster la concentration en principe actif des formulations. La concentration réelle de la solution de formulation diluée est calculée précisément à partir de la courbe d'étalonnage. La cercosporin commerciale ou extraite est disponible en très faible quantité pour pouvoir être pesée et pour déterminer la concentration molaire. Par conséquent son domaine de linéarité ne peut être déterminé.

Tableau II.2 : Domaine de linéarité, limite de détection et de quantification des composés utilisés.

système	pesticide	domaines de linéarité (M)	LMQ (M)	LMD (M)
HPLC Merck-Hitachi	Chlorothalonil	$10^{-7} - 3 \times 10^{-4}$	10^{-7}	$<10^{-7}$
HPLC 1050	Chlorothalonil	$10^{-7} - 5 \times 10^{-4}$	10^{-7}	$<10^{-7}$
HPLC Waters	Cycloxydime	$10^{-7} - 5 \times 10^{-4}$	10^{-7}	$<10^{-7}$
UPLC Acquity	Cycloxydime	$10^{-7} - 3 \times 10^{-4}$	10^{-7}	$<10^{-7}$
HPLC Waters	Khellin	$10^{-7} - 10^{-4}$	$<10^{-6}$	$<10^{-7}$
HPLC Waters	Visnagin	$10^{-7} - 10^{-4}$	$<10^{-6}$	$<10^{-7}$

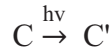
8.3 Spectrométrie de masse

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées au Centre Régional de Mesures Physiques (CRMP) de Clermont-Ferrand. L'appareillage utilisé est un Q-TOF-Micro/Waters 2699 couplé à une HPLC Waters équipée d'un détecteur UV-Visible, d'un module Waters 2695 comprenant deux pompes et un passeur d'échantillon thermostaté. Les composés sont séparés en phase inverse sur une colonne Nucléosil 100-5 C18, 150 mm \times 2,1 mm \times 3,5 μ m à 20 °C. L'élution se fait avec un mélange d'acétonitrile et d'eau acidifiée avec l'acide formique (0,5%) en mode gradient. Le gradient d'élution commence avec 5% d'acétonitrile et atteint 95% en 15 min linéairement. La composition du gradient est maintenue pendant 10 minutes et ensuite ramenée à 5% d'acétonitrile en 10 minutes. Le débit est de 0,2 ml min⁻¹. Les composés sont ionisés par electrospray (ESI) et analysés en mode positif. La gamme des ions détectés est m/z de 90 à 1000. Les chromatogrammes sont traités avec le logiciel MassLynx version 4.

9. Cinétiques de phototransformation sur film de cire

Le suivi de $C_t/C_0 \times 100$ en fonction du temps donne le profil de disparition du pesticide étudié. C_t représente la concentration restant à la surface du film ou de la feuille au temps t et C_0 la concentration moyenne des échantillons conservés à l'obscurité et rincés juste après évaporation du solvant. Un tracé linéaire du logarithme de C_t/C_0 en fonction du temps confirme que la cinétique est de pseudo-premier ordre. Par régression linéaire, on estime la constante de vitesse apparente de la réaction. Le logiciel utilisé pour établir la régression est Origin 8.0 pro. Pour les études sur films de cire, quatre répliquats sont réalisés pour chaque temps d'irradiation. L'expérience est répétée une seconde fois puis la moyenne des constantes de vitesse est choisie.

Les équations permettant de déterminer la constante de vitesse d'une réaction de premier ordre sont décrites ci-dessous. Soit C, un composé qui se transforme en C' sous l'influence de la lumière :



l'équation décrivant la vitesse de disparition de C en fonction du temps s'écrit :

$$v = - \frac{d[C]}{dt} = k \cdot [C]$$

on peut alors écrire :

$$\frac{d[C]}{[C]} = - k \cdot dt$$

l'intégration de cette dernière s'écrit :

$$\int_{C_0}^{C_t} \frac{d[C]}{[C]} = - \int_0^t k \cdot dt$$

où C_0 est la concentration initiale et C sa concentration à l'instant t. On obtient :

$$\ln [C_t] - \ln [C_0] = - k \cdot t$$

ou encore :

$$\ln \frac{[C_t]}{[C_0]} = - k \cdot t$$

l'équation est généralement exprimée sous la forme suivante :

$$[C_t] = [C_0] \cdot e^{-kt}$$

Ainsi, une réaction de premier ordre est caractérisée par une dépendance linéaire du logarithme du rapport C_t/C_0 avec le temps.

Le temps de demi-vie est le temps au bout duquel la concentration du réactif est réduite de moitié. On peut donc écrire :

$$[C_{t_{1/2}}] = \frac{[C_0]}{2}$$

$$\ln(2) = k \cdot t_{1/2}$$

La durée de vie du composé C, notée τ , est l'inverse de la constante de vitesse de réaction. Il est exprimé en secondes.

$$\tau = \frac{1}{k}$$

Références

1. Calvert, J. G.; Pitts, J. N. Photochemistry, *Angew. Chem.* **1967**, 79, 730-782.
2. Ter Halle, A.; Drncova, D.; Richard, C. Phototransformation of the herbicide sulcotrione on maize cuticular wax. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40, 2989-2995.
3. Verardo, G.; Pagani, E.; Geatti, P.; Martinuzzi, P. A thorough study of the surface wax of apple fruits. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 376, 659-667.
4. Szafranek, B. M.; Synak, E. Z. Cuticular waxes from potato (*Solanum tuberosum*) leaves. *Phytochemistry*, **2006**, 67, 80-90.
5. Freund, M.; Csikos, R.; Keszthelyi, S.; Mozes, G. Paraffin products: properties, technologies, applications. *Developments in petroleum science.* **1982**.
6. Forester, A.; Zabkiewicz, J. A.; Riederer, M. Mechanisms of cuticular uptake of xenobiotics into living plants: 1. Influence of xenobiotic dose on the uptake of three model compounds applied in the absence and presence of surfactants into *Chenopodium album*, *Hedera helix* and *Stephanotis floribunda* leaves. *Pest Manag. Sci.* **2004**, 60, 1105-1113.
7. Hirt, R.; Schmitt, R.; Searle, N.; Sullivan, A. Ultraviolet spectral energy distribution of natural sunlight and accelerated test light sources. *J. Opt. Soc. Am.* **1960**, 50, 706-713.
8. Zepp, R. G.; Cline, D. M. Rates of direct photolysis in aquatic environment. *Curr. Res.* **1977**, 11, 359-366.
9. Dulin, D.; Mill, T. Development and evaluation of sunlight actinometers. *Environ. Sci. Technol.* **1982**, 16, 815-820.
10. Kirkwood, R. C. Recent developments in our understanding of the plant cuticle as a barrier to the foliar uptake of pesticides: uptake of agrochemicals and pharmaceuticals. *Pest. Sci.* **1999**, 55, 69-77.
11. Schynowski, F.; Schwack, W. Photochemistry of Parathion on plant surfaces-relationship between photodecomposition and Iodine number of the plant cuticle. *Chemosphere* **1996**, 33, 2255-2262.
12. Aminian-Saghafi, T.; Nasini, G.; Caronna, T.; Braun, A. M.; Oliveros, E. Quantum Yields of singlet-oxygen production by some natural quinoid fungal metabolites and derivatives. *Helv. Chim. Acta.* **1992**, 75, 531-538.
13. Daub, M.; Ehrenshaft, M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2000**, 38, 461-490.
14. Jenns, A. E.; Daub, M. E.; Upchurch, R. G. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. *Phytopathology* **1989**, 79, 213-218.

15. Daub, M. Cercosporin, a photosensitizing toxin from *Cercospora* species. *Physiol. Biochem.* **1982**, 72, 370-374.
16. Jiménez, M. M.; Bahena, S. M.; Espinoza, C.; Trigos, A. Isolation, characterization, and production of red pigment from *Cercospora piaropi* a biocontrol agent for waterhyacinth. *Mycopathologia* **2010**, 169, 309-314.

CHAPITRE III

PHOTOTRANSFORMATION DU CHLOROTHALONIL

1. Introduction

Le chlorothalonil (CT) est un fongicide foliaire non-systémique à large spectre d'action très utilisé. C'est un fongicide multi-site et de ce fait peu sujet aux problèmes de résistance des pathogènes¹. Au contraire, les fongicides à site-unique, tels que les strobilurines, phénylamides, amides acides-carboxyliques et les cyano-acétamides-oximes qui agissent de manière spécifique sur le métabolisme du pathogène exposent la plante aux risques de formation de pathogènes résistants. Dès lors, CT est de plus en plus employé en alternance ou en mélange avec ces fongicides^{1,2}.

Présent sur le marché depuis plus de 40 ans, plus de 4000 articles scientifiques lui sont consacrés. Ces publications traitent essentiellement du devenir de la molécule dans l'environnement aqueux, dans les sols et l'atmosphère. Près d'une cinquantaine seulement abordent sa photodégradation. Parmi ces derniers, seuls quatre ont étudié sa photodégradation sur les plantes³⁻⁶.

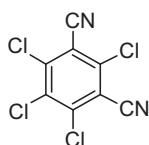


Figure III.1: Structure du chlorothalonil.

Ce chapitre présente dans un premier volet les propriétés physico-chimiques du composé, les principales données sur son devenir dans l'environnement, notamment sous l'action de la lumière et les principaux produits de dégradation décrits dans la littérature.

Le deuxième volet de ce chapitre concerne l'étude proprement dite. Il est constitué par l'article et son supporting information publié dans le journal « Environmental Science and Technology ». Dans ce travail, nous avons pour objectif d'évaluer et de comprendre la réaction photochimique du chlorothalonil lorsqu'il est déposé sur un film de cire dans des conditions voisines de celles existantes sur les plantes traitées. En parallèle, nous avons examiné la photochimie de la molécule en solution, dans des solvants de structure chimique proche de celle des constituants des cires et la photochimie sur cire pour le composé pur et formulé. A la suite de cela, nous avons décrit de façon détaillée des données présentées succinctement dans l'article et l'influence d'additifs dans la cire tels que le β -carotène sur la vitesse de phototransformation du chlorothalonil.

Le dernier volet de ce chapitre rassemble les essais de suivis directs du chlorothalonil dans des cires ou cuticules de fruits.

2. Données sur le chlorothalonil

2.1 Propriétés physico-chimiques

Les données physico-chimiques sont résumées dans le Tableau III.1. En raison de sa structure benzénique et de la nature de ses substituants (Cl et CN), la molécule est très faiblement soluble dans l'eau (solubilité de 0,6 mg/l). De plus, la répartition des atomes de chlore et des groupements nitriles sur le cycle est telle que son moment dipolaire doit être très faible. Son spectre d'absorption et le rayonnement solaire atteignant la surface de la terre sont donnés Figure III.1. La molécule absorbe bien au-delà de 300 nm et absorbe donc largement les photons solaires.

Tableau III.1 : Données issues la littérature^{7,8}.

Propriétés du chlorothalonil	
solubilité dans l'eau à 25°C (mg/L)	0,6
solubilité dans le n-heptane à 20°C (g/L)	0,2
log K _{ow}	2,89
mp (°C)	250-251
Masse molaire (g/mole)	265,9
pression vapeur à 25°C (mm Hg)	$5,7 \times 10^{-7}$

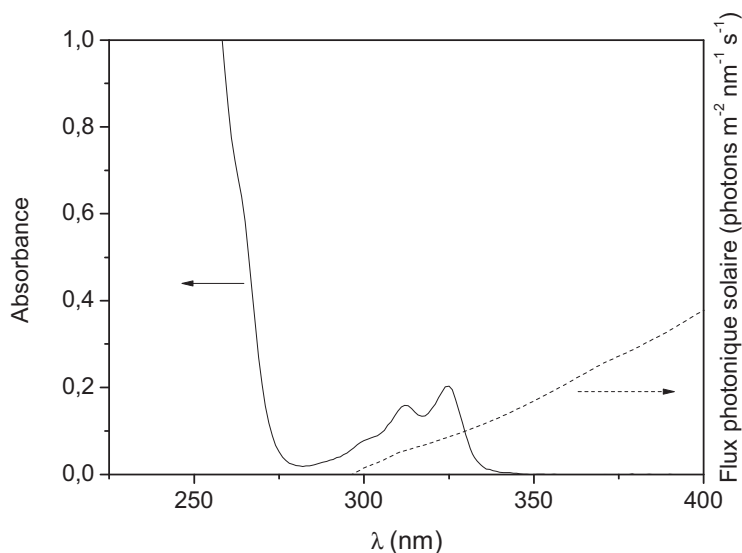


Figure III.2 : Spectre d'absorption de CT à 10^{-4} M dans le méthanol (trait plein) et distribution spectrale des photons solaires arrivant à la surface de la terre (pointillé).

L'efficacité fongicide de cette molécule dépend directement de sa persistance à la surface de la plante. Le CT forme une barrière protectrice à la surface de la plante et inhibe le développement du pathogène avant même qu'il puisse atteindre les tissus foliaires¹. Sa faible solubilité dans l'eau lui confère une bonne résistance au lessivage. D'ailleurs, l'une des formulations commerciales de CT, le BRAVO 720 ®, est prônée pour être résistante au lessivage de la pluie. Bien que la molécule soit persistante, elle est employée dans certains pays à très forte dose. Le climat humide des tropiques est non seulement favorable au développement des champignons mais le risque de déperdition de pesticide est également plus élevé à cause du ruissellement des gouttes de pluie sur les feuilles. Une préoccupation particulière est son usage sur les plantations de bananes où les fréquences d'application peuvent atteindre jusqu'à 45 fois par an à des taux de 1,4 L/ha⁹.

2.2 Devenir dans l'environnement-photolyse

Son devenir dans l'environnement aquatique a été très étudié. CT est relativement stable à l'**hydrolyse en milieu neutre ou acide**, avec aucune conversion notée jusqu'à 50 jours à pH 5 et 7. En milieu basique (pH 9), le composé s'hydrolyse avec une durée de demi-vie ($t_{1/2}$) de 38 jours¹⁰. L'ajout de sédiments et de communautés microbiennes accélèrent la dégradation avec une durée de $t_{1/2}$ ramenée à 2-3 jours¹¹.

En présence de lumière, $t_{1/2}$ est significativement réduit, des valeurs de 1 à 101 heures sont rapportées¹¹⁻¹³. A partir des données bibliographiques sur la photolyse de CT nous pouvons conclure que la phototransformation est une voie de dégradation importante. Elle est amplifiée par la présence de matière organique dissoute (MOD) dans le milieu¹³. Si il est connu que les MOD et autres chromophores absorbent la lumière solaire et peuvent induire des réactions photochimiques des polluants¹⁴, les mécanismes impliqués ne sont pas connus.

La faible pression de vapeur de CT indique qu'il est peu volatil¹⁵. D'ailleurs, les travaux de *Bedos, C. et al.* montrent que les pertes dues à la volatilisation à partir des surfaces foliaires sont faibles¹⁶. Par exemple, une perte d'environ 5% au bout d'une semaine après l'application sur un champ de blé est mesurée. La **pénétration** foliaire est également un processus lent ; en utilisant les données obtenues sur du CT radio-marqué sur les feuilles de pommier, nous pouvons estimer la vitesse de pénétration de CT à $0,11 \text{ jour}^{-1}$ ($t_{1/2} = 6,3 \text{ jours}$ ¹⁷).

De nombreuses publications rapportent sur la phototransformation du CT mais les données concernent essentiellement les temps de demi-vie de la molécule et la nature de ses photoproduits dans les différents compartiments de l'environnement. Aucune étude mécanistique n'a été jusqu'à présent réalisée. Le rendement quantique de photodégradation (Φ_{deg}) est un paramètre qui renseigne sur la réactivité photochimique d'un composé. C'est le rapport du nombre de molécules ayant réagi sur le nombre de photons absorbés par cette dernière. Ce paramètre a été mesuré par Millet et al. dans des solvants organiques¹⁸ ; des valeurs de $(2,6 \pm 0,5) \times 10^{-4}$ dans l'acétonitrile, $(2,0 \pm 0,3) \times 10^{-3}$ dans l'hexane et de $(1,1 \pm 0,2) \times 10^{-4}$ dans l'eau contenant 7% d'acétonitrile ont été trouvées. Ces valeurs ont toutefois été obtenues en irradiant CT au moyen d'une source de lumière polychromatique.

CT est une molécule faiblement soluble dans l'eau et de ce fait, les articles qui traitent de sa photolyse en milieu aqueux reposent sur des solutions mères dans des solvants organiques comme l'acétate d'éthyle^{11,12}, l'acétonitrile¹⁸, le benzène¹⁰ ou le méthanol¹³ qui sont ensuite éventuellement diluées dans l'eau pour atteindre des concentrations de l'ordre de 0,5 mg/L. Les produits de dégradation détectés dans les sols et les milieux aqueux sont nombreux et il est difficile de séparer les produits qui sont uniquement issus de la photolyse de ceux issus de la biodégradation et de l'hydrolyse. Nous avons choisi de présenter Figure III.3 les principaux produits rapportés dans la littérature toute voie de dégradation confondue.

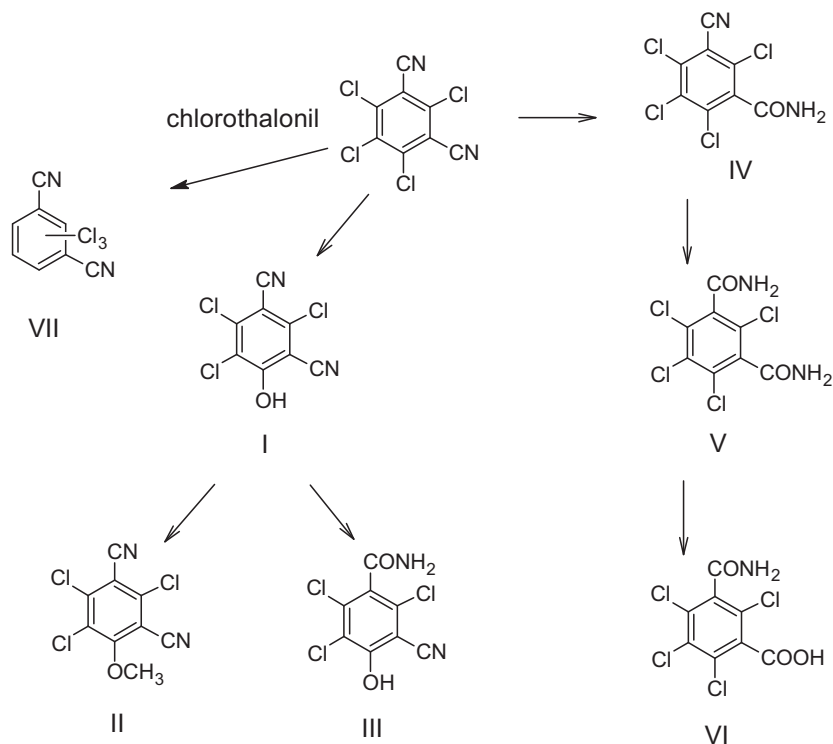


Figure III.3 : Principaux photoproduits ou métabolites de CT détectés dans les milieux aqueux et les sols.

Le 4-hydroxy-2,5,6-trichloroisophthalonitrile (**I**) résulte à la fois de l'hydrolyse et de la photolyse. Il semble être stable en absence de lumière mais assez photodégradable; sous irradiation, sa vitesse de dégradation excède celle de sa formation¹¹. En présence de lumière, il ne peut donc pas s'accumuler et sa détection sera difficile. Ce composé peut se former dans les milieux aquatiques contenant des sédiments, dans l'eau distillée basifiée¹¹ ainsi que dans les sols^{19,20}. Il est 30 fois plus toxique que le chlorothalonil²¹. Les composés **II** et **III** ont été uniquement détectés dans les sols^{22,23}, mais doivent être probablement formés à partir de **I**. Le composé **IV** est issu de la photolyse et de l'hydrolyse en milieu basique (pH 9) mais tout comme le 4-hydroxy-2,5,6-trichloroisophthalonitrile (**I**), ce composé disparaît rapidement en présence de lumière^{10,11}. Il a également été détecté dans les sols²⁰. Le métabolite **V** est un intermédiaire du métabolite **VI** qui a été détecté dans les sols²⁰. Enfin, le composé **VII** est issu de la photolyse dans l'eau¹² et de l'hydrolyse dans les systèmes contenant des sédiments¹¹. Sakkas et al. l'ont détecté sous irradiation dans l'eau distillée et dans de l'eau contenant des MOD¹³. Ils observent aussi la perte successive des atomes de chlore jusqu'à la formation du

dicyanobenzène monochloré qui a aussi été détecté dans les sols²³. Ainsi, la dégradation de CT mène à la formation de nombreux produits de réaction. Concernant la voie *photochimique*, nous pouvons conclure que trois principales réactions sont observées :

- la photoréduction avec la perte d'atome de chlore (formation de **VII** puis des autres produits de déchloration par perte successive des atomes de chlore).
- la photohydrolyse avec remplacement d'un atome de Cl par un groupement hydroxyle, cette réaction est favorisée en milieu basique (formation de **I**).
- la photohydrolyse du groupement nitrile pour former un amide (formation de **IV**).

Dans l'eau, on peut logiquement s'attendre à observer le produit **I** qui correspond à une photohydrolyse, cette réaction est très classiquement observée pour une grande variété de composés chlorés. La photoréduction dans l'eau est une réaction plus étonnante car elle nécessite la présence d'un réducteur (donneur H ou donneur d'électron). Les co-solvants ajoutés pour améliorer la solubilité de CT pourraient jouer ce rôle.

Compte tenu de ces données assez limitées sur la phototransformation du CT, il nous a semblé intéressant de reprendre l'étude en nous focalisant sur la transformation photochimique de cette molécule sur modèles foliaires²⁴⁻²⁶. On retient en effet que CT est plus exposé au rayonnement solaire que les pesticides systémiques de par son mode d'action et qu'il est souhaitable que cette substance active recouvre la feuille le plus longtemps possible. Ceci justifie largement cette étude car mieux comprendre son comportement photochimique peut aussi aider à améliorer sa formulation pour une meilleure persistance.

3. Photochimie du chlorothalonil sur cire

Notre étude sur le comportement photochimique de CT à la surface de films de cire a été publiée en 2011. L'article et son supporting information sont présentés au paragraphe 3.1.

Dans ce travail, nous avons cherché à comprendre le mécanisme de phototransformation de CT sur des films de cire de paraffine utilisés pour mimer la fine couche de cire épicuticulaire recouvrant la surface des feuilles. Il est vite apparu que le chlorothalonil subissait une photoréduction. Pour mieux expliquer les phénomènes, nous avons aussi entrepris une étude de la photochimie dans des solvants organiques tels que le n-heptane. Des expériences de photolyse-flash dans l'heptane ont en particulier permis de caractériser les états excités impliqués et leur réactivité avec l'oxygène et des donneurs H. Les rendements quantiques de phototransformation dans diverses conditions expérimentales ont aussi été mesurés. L'ensemble de ces informations a permis d'expliquer les résultats de la phototransformation du CT sur film.

3.1 Photoreduction of chlorothalonil fungicide on plant leaf models

S. Monadjemi, M. El Roz, C. Richard, and A. Ter Halle. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, 45, 9582-9589.

Photoreduction of Chlorothalonil Fungicide on Plant Leaf Models

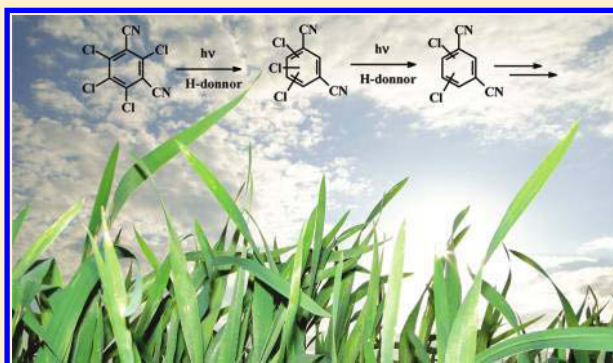
S. Monadjemi,^{†,‡} M. El Roz,^{†,‡} C. Richard,^{†,‡} and A. Ter Halle^{†,‡,*}

[†]Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire (LPMM), Clermont Université, Université Blaise Pascal, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

[‡]CNRS, UMR 6505, LPMM, F-63171 Aubière, France

S Supporting Information

ABSTRACT: Photodegradation is seldom considered at the surface of vegetation after crop spraying. Chlorothalonil, a broad-spectrum foliar fungicide with a very widespread use worldwide, was considered. To represent the waxy upper layer of leaves, tests were performed within thin paraffin wax films or in *n*-heptane. Laser flash photolysis together with steady-state irradiation in *n*-heptane allowed the determination of the photodegradation mechanisms. Chlorothalonil ability to produce singlet oxygen was measured; noteworthy its efficiency is close to 100%. Additionally, chlorothalonil photodegradation mainly proceeds through reductive dechlorination. In these hydrophobic media, a radical mechanism was evidenced. Photochemical tests on wax films under simulated solar light show that formulated chlorothalonil is more reactive than pure chlorothalonil. The field-extrapolated half-life of photolysis on vegetation was estimated to 5.3 days. This value was compared to the half-lives of penetration and volatilization available in the literature. It appears that chlorothalonil dissipation from crops is ruled by both photodegradation and penetration. The relative importance of the two paths probably depends on meteorological factors and on physicochemical characteristics of the crop leaf cuticle.



INTRODUCTION

Solar-radiation-induced degradation is an important route of pesticide dissipation in the environment.¹ It may even be the major process for some pesticides in surface water. However, photodegradation is seldom considered at the surface of vegetation after crop spraying, although it was noted about 30 years ago that “a meaningful proportion of pesticides are not stable to sunlight on crops after field application”.² Pesticide dissipation from crop leaf surfaces after spraying includes physical transport processes (volatilization, wash-off and plant uptake) and transformation processes (photodegradation, thermal degradation). For example, it was demonstrated that herbicide sulcotrione dissipation from maize leaves in the field is predominantly dependent on photodegradation compared to the other processes (volatilization, wash off, penetration).³ Dissipation from crops after spraying directly affects the pesticide efficiency. In practice, losses are generally counterbalanced by high application rates. If these losses were taken into consideration and estimated, they could be overcome by formulation adjustments for example. It was shown that an optimal adjuvant combination can reduce the effective pesticide dose by as much as 10-fold,⁴ which obviously represents an important progress with regard to the environmental impact.

Chlorothalonil (2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile, CT figure 1) is a broad-spectrum nonsystemic foliar fungicide.⁵ This is one of the most commonly used fungicides worldwide. CT is used to control

many fungal diseases in a wide range of crops, especially vegetables and fruits. CT is also the most common pesticide used to control fungal diseases in turf. Turf application rates are among the highest of all labeled used patterns. CT has been available since 1964, and its use is still common. In 2001, it ranked 13th in pesticide usage with approximately 4 to 5 million kg active ingredient to crops in the U.S.⁶ New systemic fungicides, such as sterol biosynthesis inhibitor (tebuconazole and propiconazole) and strobilurin fungicides (azoxystrobin and trifloxystrobin), have provided new options for disease management. However, these fungicides have highly specific modes of action, which have prompted concerns in the development of fungicide resistance. The combination of these new fungicides with chlorothalonil has been recommended as resistance prevention.⁷

The environmental fate of CT has been well documented since the early 1970s. Degradation in soil is primarily microbial, and the major reported metabolite is 4-hydroxy-2,5,6-trichloroisophthalonitrile (OH-CT).⁸ In surface water, CT is resistant to hydrolysis, photolysis and volatilization. CT fate in surface water is ruled by microbial metabolization; the main metabolite is OH-CT.⁹ At several estuarial locations, CT was detected with maximum

Received: April 27, 2011

Accepted: September 27, 2011

Revised: September 27, 2011

Published: September 27, 2011

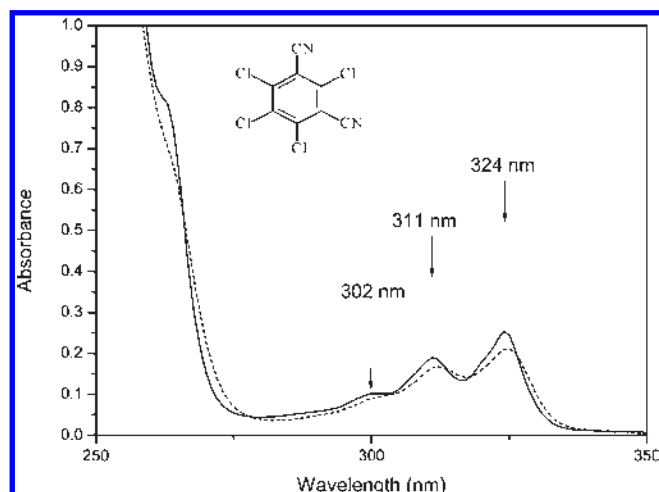


Figure 1. Structure of chlorothalonil and absorption spectra in methanol (dash line) and in heptane (solid line) at 10^{-4} M (with a 1 cm optical path).

levels of 1.1 ng L^{-1} , while OH-CT was detected in river waters at higher levels (up to 14 ng L^{-1})^{10,11}. This metabolite appears to be more toxic than the parent compound.⁹ Aside from OH-CT, many other degradation products resulting from reductive dechlorination or oxidation/hydrolyzation reactions via biotic^{13,14} and abiotic routes^{9,15–18} have been identified under laboratory conditions.

CT aqueous photochemistry has been investigated but the studies focused on kinetic aspects;^{15,18,19} the mechanism of CT photodegradation has never been discussed. In addition, CT photolysis has been reported to be not significant in the aquatic media.⁹

In this paper, we aimed at estimating and rationalizing CT photodegradation on leaves. CT photoreactivity on leaves can be drastically different from that in aquatic media, as was demonstrated for other pesticides.²⁰ Photochemical degradation of pesticides on crops occurs mainly within the outermost micrometer of plants. Once the pesticide has entered the leaves the photochemical reactions are decreased due to shielding effect; the plant metabolism also comes into play and prevails. The surface of leaves, the cuticle, is mainly made of cuticular wax. A first good approach to estimate the phenomenon in the field is a set of laboratory tests on thin wax films. At least some precautions should be taken, the pesticide concentration should be within the range encountered in the field, because some concentration effects have been demonstrated²¹ and simulated solar irradiations are recommended. Under these conditions it was demonstrated for example, that herbicide sulcotrione rate of photolysis is of the same order of magnitude with the laboratory set and field monitoring.²² Furthermore, tests were also performed in *n*-heptane in this study. This is not a classical solvent used for environmental studies, but its hydrophobicity makes it a suitable solvent in this particular case. The transition from wax paraffin (linear alkane chains containing 20–40 carbon atoms) to *n*-heptane is only a reduction of the aliphatic chain length with no modification of the functional groups between the two media. Laser flash photolysis together with steady-state irradiation allowed the determination of the mechanisms of chlorothalonil photodegradation. Finally, the field-extrapolated rate of photolysis was compared with rates of penetration and volatilization available in the literature and discussed.

EXPERIMENTAL SECTION

Kinetic Equations. The quantum yields and rate constants for CT photodegradation are represented in Scheme 1. The reaction rate constants are specified for CT deactivation (k_d , s^{-1}), CT reactivity with oxygen to produce singlet oxygen (k_{O_2} , $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), CT deactivation by oxygen (k'_{O_2} , $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) CT reactivity with *n*-heptane (k_h , s^{-1}) and with a hydrogen donor molecule if added (k_{RH} , $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). CT apparent first order constant of photodegradation k_{deg} is expressed as follows:

$$k_{\text{deg}} = I_e \Phi_{\text{ISC}} \frac{k_{\text{RH}}[\text{RH}] + k_h}{k_{\text{RH}}[\text{RH}] + k_h + k_d + K_{\text{O}_2}[\text{O}_2] + k'_{\text{O}_2}[\text{O}_2]}$$

Φ_{ISC} is the quantum yield of intersystem crossing and I_a the photon fluence rate. Quantum yield singlet oxygen production (Φ_{SO}) and of photodegradation (Φ_{deg}) are expressed as follows:

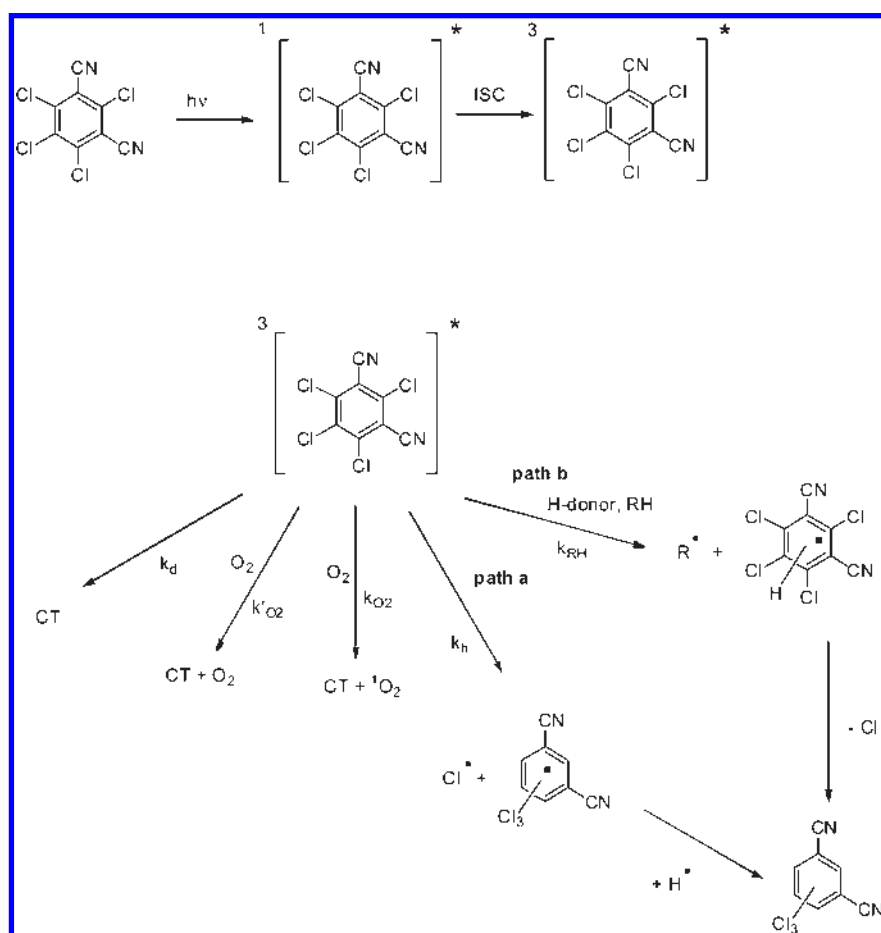
$$\Phi_{\text{deg}} = \Phi_{\text{ISC}} \frac{k_{\text{RH}}[\text{RH}] + k_h}{k_{\text{RH}}[\text{RH}] + k_h + k_d + k_{\text{O}_2}[\text{O}_2]}$$

and

$$\Phi_{\text{SO}} = \Phi_{\text{ISC}} \frac{k_{\text{O}_2}[\text{O}_2]}{k_{\text{RH}}[\text{RH}] + k_h + k_d + k_{\text{O}_2}[\text{O}_2]}$$

Chemicals and Standards. All solvents and chemicals were used as received. Chlorothalonil (99.3%) was purchased from Fluka (Saint-Quentin Fallavier, France). Commercial formulations of chlorothalonil, Fongil FL (500 g L^{-1} chlorothalonil), were obtained from a regular agricultural shop. 1,3-Diphenylisobenzofuran (97%), perinaphthenone (97%), isoprene (99%), paraffin wax (mp $70\text{--}80^\circ\text{C}$) and spectrophotometric-grade *n*-heptane (99%) were all purchased from Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Synperonic 10/6 (Polyoxyethylene C9–C11 alcohol) was provided by Uniquema (Paterson, NJ). 4-Nonylphenol (mixture of compounds with branched side chains) was provided by TCI (Tokyo Kasei, Japan). Anthracene (99%) was provided by Alfa Aesar (Alfa Aesar, Schillingheim, France). Water was purified using a Millipore Milli-Q system (Millipore αQ , resistivity $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, $\text{DOC} < 0.1 \text{ mg L}^{-1}$). Pyridine (99%) was supplied by Lancaster (Alfa Aesar, Schillingheim, France) and 4-nitroanisole (97%) by Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Methanol (99%, HPLC grade) was provided by Riedel de Haën (Saint-Quentin Fallavier, France).

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Irradiated solutions of CT were analyzed by HPLC. Samples irradiated in acetonitrile were analyzed using a reversed phase column as well as the methanol solutions used to rinse the irradiated wax films. Irradiated samples in *n*-heptane were monitored by normal phase HPLC. CT detection limit was around 10^{-6} M which is below the concentration range of the study. Separations in the reversed-phase mode were performed on a Hewlett-Packard series 1050 HPLC system consisting of an autosampler, a pump, and a diode-array detector. The column used for these separations has the following specifications: C18, Nucleodur supplied by Machery-Nagel, 150 mm long, 4.6 mm internal diameter, and $5 \mu\text{m}$ particle size. The mobile phase consisted of 70% methanol and 30% water with a flow rate of 1 mL min^{-1} and UV detection at 232 nm. CT retention time in these conditions was 7.5 min. Separations in the normal-phase mode were performed on a Merck-Hitachi HPLC system consisting of an autosampler (AS-2000), a pump (L-6200A), and a UV/vis detector (L-4250). The column

Scheme 1. Proposed Mechanism of CT Homolytic Photodehalogenation in *n*-Heptane^a

^a Both quantum yields were measured at 313 nm at 298 K in air-saturated *n*-heptane (oxygen concentration in *n*-heptane is 2.8×10^{-3} M); Φ_{ISC} is close to unit and Φ_{deg} equals $(2.0 \pm 0.1) \times 10^{-2}$. The primary photoproducts are the dechloro-congeners, as further dechlorinated congeners have been identified by GC-MS; they are probably phototransformed according to the same degradation path as the parent molecule.

used for these separations has the following specifications: Silica, Sunfire supplied by Waters, 250 mm long, 4.6 mm internal diameter, and 5 μ m particle size. The mobile phase consisted of 1% isopropanol and 99% *n*-heptane with a flow rate of 1 mL min⁻¹ and UV detection at 232 nm. CT retention time in normal phase was 3.8 min.

Gas Chromatography with Electron Impact Mass Spectrometry (GC/EI-MS). The method was adapted from Penuela et al.¹⁵ A Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph coupled to a Hewlett-Packard 5973 mass spectrometer was used for GC-MS in electron impact (EI) mode. A HP-5MS capillary column (30 m \times 0.25 mm inner diameter, 0.25 μ m film thickness) was programmed to heat from 60 to 300 at 10 $^{\circ}$ C min⁻¹; the final temperature was held 20 min. The injector and transfer line temperatures were both held at 280 $^{\circ}$ C. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.2 mL min⁻¹. The injection volume was 1 mL in the split mode. For the mass spectrometer, the ionization energy was 70 eV, and the temperature of the ion source was 280 $^{\circ}$ C. CT and its photodegradation products were identified by GC/EI-MS. The retention time were 14.3 min for CT, 12.7 and 12.8 min for the monodechlorinated congeners, 10.8 and 11 min for the didechlorinated congeners and 8.8 min for the tridechlorinated congeners detected.

Laser Flash Photolysis (LFP). Laser flash photolysis experiments were carried out using an Applied Photophysics LKS.60

apparatus equipped with a Nd³⁺:YAG laser Quanta-Ray GCR-130. Samples were irradiated using the fourth harmonic (266 nm, 9 ns pulse duration, the beginning of the measure starts 20 ns after the laser flash) in a quartz cuvette. The experimental details are described elsewhere.²³ Solutions were deoxygenated by nitrogen bubbling directly in the cell and changed after each shot to avoid excessive exposure. The energy transfer reaction between the triplet excited state of chlorothalonil (10^{-4} M) and anthracene (4×10^{-4} M) was studied in an argon deoxygenated mixture of *n*-heptane/isooctane (50:50, v/v) upon at 266 nm. The anthracene triplet excited-state build-up was monitored at 421 nm in the absence and in the presence of chlorothalonil. The quantum yield of the chlorothalonil triplet excited-state formation was estimated assuming a complete energy transfer between CT and anthracene (see the Supporting Information (SI)). Potassium peroxodisulfate was used as a chemical actinometer ($\epsilon_{450}\Phi_{ISC} = 1900 \pm 150$ M⁻¹cm⁻¹).²³ The quenching of the chlorothalonil triplet excited state by phenol was investigated by varying the phenol concentration within the range 3×10^{-4} – 2×10^{-3} M in air-saturated *n*-heptane.

Steady-State Irradiation Experiments in Solution. For the irradiation experiments, a stock solution of 2.7 mg of CT in 100 mL of *n*-heptane (10^{-4} M) was prepared. Irradiations were performed at 313 nm in a quartz cuvette (1 cm optical length)

using a mercury arc lamp (200 W) equipped with a Schoeffel monochromator. To deoxygenate the solutions, argon was bubbled for 10 min prior to irradiation. The cuvette was then closed using a valve system. Due to the volatility of *n*-heptane, the CT concentration was recalculated after deoxygenation. This recalculation was done using the absorbance of the solution. To measure the quantum yield of singlet oxygen formation (Φ_{SO}), the probe 1,3 diphénylisobenzofuran was used in the concentration range 10^{-5} to 10^{-4} M in *n*-heptane,²⁴ details of the method used is described in the SI. Φ_{SO} was calculated with a method described in the SI. To assess singlet oxygen reactivity toward CT, perinaphthenone (10^{-5} M) was used as a sensitizer and excited at 365 nm. Actinometry was measured according to the method described by Calvert and Pitts,²⁵ the photon fluence rate was 1.67×10^{15} photons $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 313 nm and 5.86×10^{15} photons $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 365 nm.

Steady-State Irradiation Experiments on Wax Films. The procedure has been described recently.²⁰ Recommendations for chlorothalonil application are between 500 and 1000 g/ha. The applied rates on paraffin films were set within these ranges. Chlorothalonil solution in methanol (10^{-4} M) was added with a micropipet on top of wax films (1.5 mL for each dish of 3.2 cm diameter). Methanol was allowed to evaporate overnight. Fongil solutions were prepared in water, with a dilution factor of 36 000. The surface concentration of chlorothalonil was ultimately equal to 5×10^{-8} g m^{-2} . After irradiation at 550 W m^{-2} (irradiance within the range 300–800 nm), films were rinsed with methanol, and samples were analyzed by HPLC. The recovery yields were estimated as $95\% \pm 5\%$ using nonirradiated samples. Control samples were run concomitantly in the dark.

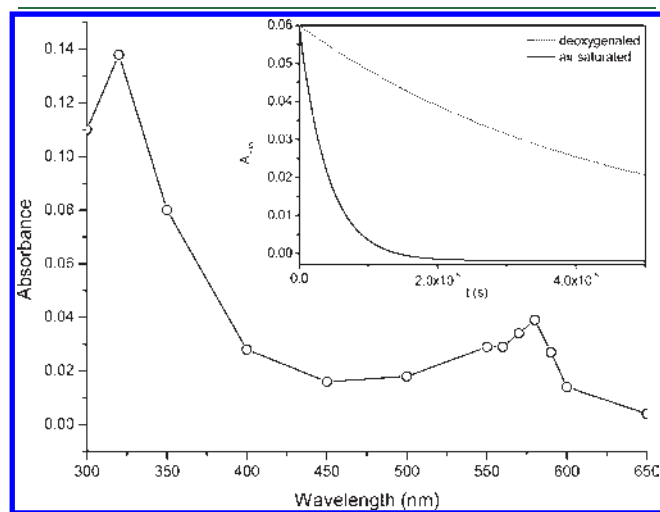


Figure 2. Transient absorption spectrum measured at the end of the pulse upon excitation at 266 nm in a deoxygenated solution of CT (10^{-4} M) in heptane. Inset: absorbance decay monitored at 320 nm in deoxygenated (dot line) and in air-saturated media (solid line).

To achieve an amount of surfactant that is five times higher in weight than the active ingredient, surfactants containing solutions were prepared as follows: 33 mg of polyoxyethylene alcohol (spreading agent, synperonic 10/6) was added to 250 mL of CT stock solution (10^{-4} M) and 36 mg of 4-nonylphenol was added to 250 mL of CT stock solution (10^{-4} M).

Quality Control. For quantum yield measurements, all experiments were performed at least in triplicate and analyzed twice by HPLC. For kinetic measurements on wax films, each point was realized in quadruplicate. Results presented are an average of replicates given with standard deviation error.

RESULTS AND DISCUSSION

Phototransformation in Solution. *CT Absorption Characteristics.* In *n*-heptane, CT shows two bands of absorption at 311 ($\epsilon=1570 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) and 324 nm ($\epsilon=2250 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Figure 1). There is a slight hypsochromic shift (1 nm) and higher absorption coefficients compared to more polar solvents such as methanol. The CT absorption spectrum in aqueous solution is not reported in the literature due to a low solubility²⁶ ($<1 \text{ mg L}^{-1}$ at pH 7). The CT absorption spectrum in *n*-heptane overlaps with solar radiation spectrum; CT is therefore susceptible to direct photolysis.

Implication of CT Triplet State. Laser flash photolysis at 266 nm of CT in argon-saturated *n*-heptane ($A_{266} = 0.1$) yields the transient absorption spectrum at the end of the pulse shown in Figure 2. Two maxima at 320 and 575 nm are observed. The first-order-decay rate constant is $2.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ in the absence of oxygen and $2.4 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ in air-saturated *n*-heptane (see inset of figure 2). Because the oxygen concentration is $2.8 \times 10^{-3} \text{ M}$,²⁷ a bimolecular rate constant of $7.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ is obtained for the oxygen quenching. This reactivity toward oxygen strongly suggests that the intermediate species is the triplet excited state. To confirm this hypothesis, we carried out energy transfer reactions using anthracene as an energy acceptor. From these experiments, one could estimate a quantum yield of inter system crossing (Φ_{ISC}) of at least 0.70 (see SI). Steady-state monochromatic irradiations at 313 nm were also performed to measure the pseudofirst-order rate constants and the quantum yields of the CT phototransformation. In air-saturated *n*-heptane, CT shows a low quantum yield of photodegradation ($\Phi_{\text{deg}} = (2.0 \pm 0.1) \times 10^{-2}$, Table 1 entry 1). This value is higher than that reported by Millet et al. in hexane ($\Phi_{\text{deg}} = (2.2 \pm 0.3) \times 10^{-3}$), but the difference may be explained by the imprecision of polychromatic quantum yield measurements in this latter case.²⁶ In deoxygenated *n*-heptane, the quantum yield of photodegradation is increased by a factor of 4 to 5 ($\Phi_{\text{deg}} = (9 \pm 0.1) \times 10^{-2}$, Table 1 entry 2). As oxygen is a triplet quencher, the lowering of Φ_{deg} in air-saturated medium confirms the involvement of the CT triplet excited state in the reaction. This result also shows that the chemical transformation of CT is not due to reaction with oxygen.

Table 1. Chlorothalonil Rate Constant (k_{deg}) and Quantum Yield of Photodegradation (Φ_{deg}) in Solution

entry	solvent	conditions	($k_{\text{deg}} \pm \sigma$) (s^{-1})	($\Phi_{\text{deg}} \pm \sigma$)
1	<i>n</i> -heptane	air saturated	$(1.1 \pm 0.06) \times 10^{-4}$	$(2.0 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
2	<i>n</i> -heptane	deoxygenated	$(6.8 \pm 0.1) \times 10^{-4}$	$(9.0 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
3	<i>n</i> -heptane +5% isopropanol	air saturated	$(3.4 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	$(3.4 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
4	<i>n</i> -heptane +2% phenol	air saturated	$(4.9 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	$(5.4 \pm 0.2) \times 10^{-2}$
5	acetonitrile	air saturated	$(7.5 \pm 0.2) \times 10^{-6}$	$(9.7 \pm 0.2) \times 10^{-4}$

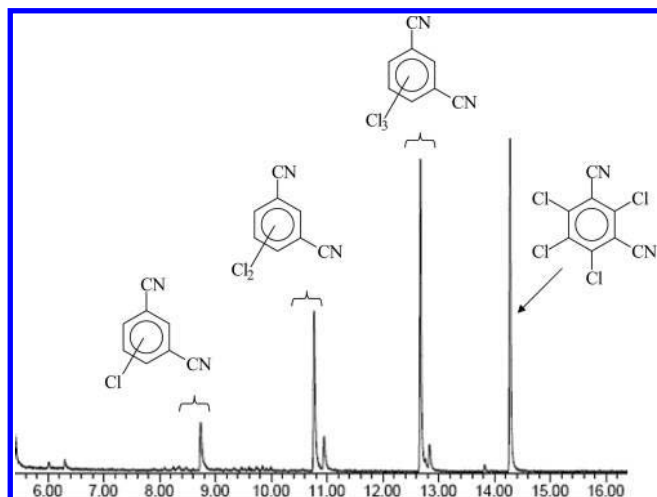


Figure 3. GC-MS chromatogram of an irradiated chlorothalonil solution.

Because the CT triplet excited state is efficiently quenched by oxygen, we tried to measure the ability of CT to generate singlet molecular oxygen using chemical trapping. Φ_{SO} was estimated close to unit (see sSI). Thus, CT very efficiently sensitizes the formation of singlet oxygen. The fact that Φ_{ISC} is only 0.7 while Φ_{SO} equals 1 is surprising because singlet oxygen is expected to arise from the triplet excited state and thus Φ_{ISC} and Φ_{SO} should be close. 1,3-Diphenylisobenzofuran has for long shown its ability as a chemical scavenger for singlet oxygen titration and thus Φ_{SO} is reliable. The experiment of energy transfer to anthracen in contrast probably underestimates Φ_{ISC} . First, absorbances are measured 1 μ s after the pulse end when the absorbance of triplet anthracen is maximum, thus a part of triplets is lost. Second, the anthracen concentration may be not high enough for full trapping of the chlorothalonil triplets, but it cannot be increased for solubility reasons.

Further investigations were initiated to determine whether CT could be oxidized by singlet oxygen. Perinaphtenone, a classical singlet oxygen sensitizer, was selectively excited at 365 nm, where CT absorption is zero. No depletion of CT concentration was observed under these conditions, demonstrating the stability of CT against singlet oxygen.

CT Photodehalogenation. In the literature, CT and its degradation products have been primarily analyzed by gas chromatography.²⁸ Here, GC-MS analysis of photoproducts formed in air-saturated or deoxygenated *n*-heptane mainly yields dechlorinated compounds (Figure 3). The EI spectrum of CT exhibits a parent ion at m/z 266 with the quadruplet in the correct ratio for four Cl atoms. In contrast, the primary photoproducts show a parent ion at m/z 230 in accordance with the replacement of a chlorine atom by a hydrogen atom. This attribution is confirmed by the good agreement with the mass spectra reported in the literature regarding aqueous photolysis of CT.^{15,16,18} There are three possible isomers of trichloro-1,3-dicyanobenzene, but only two were detected in this study. The isomer discrimination is not possible without standards. Further reductive dechlorination also occurs; two isomers of dichloro-1,3-dicyanobenzene have also been detected. Their mass spectra also correspond with that reported in the literature. One isomer of monochloro-1,3-dicyanobenzene was also detected. Its identification has already been clearly demonstrated¹⁵ because it presents a characteristic fragmentation pattern (ions

at m/z 162, 134, 127, 100, and 74). The mass spectra of CT and its dechlorinated congeners are given in the SI.

In comparison, the literature data concerning the distribution pattern of CT degradation products in aqueous media are more complex, depending on the constitution of the aqueous solution, that is, whether humic matter was added and whether a solvent was used to dissolve CT. HO-CT is proposed to be formed by a photoassisted nucleophilic substitution but was not detected because it is very quickly degraded by light at a rate exceeding that of production.¹⁸ In pure water, only trichloro-1,3-dicyanobenzene has been detected and quantified.¹⁸ The presence of natural organic matter allows photoreduction through the formation of dichloro- and chloro-1,3-dicyanobenzene. In conclusion, the presence of hydrogen donors such as organic matter favors CT reductive dechlorination in water. It is important to note that the recovery of CT degradation products is always very low. When the formation of the dehalogenated congeners is quantified with standards, they are found in very low chemical yields, even if no other degradation products were detected.¹⁵

Given the photoproducts identification, reductive dehalogenation is the only identified route for CT phototransformation in *n*-heptane. CT photodegradation is also promoted by good hydrogen donor compounds. The CT quantum yield of photolysis in polar aprotic solvents such as acetonitrile shows a marked decrease compared to *n*-heptane ($\Phi_{deg} = (9.7 \pm 0.2) \times 10^{-4}$, Table 1 entry 4). On the contrary, the addition of a good hydrogen donor such as 2-propanol or phenol in aerated *n*-heptane increases the quantum yield of photodegradation by 1.7 to 2.7 (Table 1 entries 3 and 4).

Besides the photoreduction of CT, photoaddition could be envisaged. According to Jahn et al., CT can undergo a photoaddition to olefinic compounds of the plant cuticle.²⁹ They have investigated the formation of bound residues to the cuticle by immunoassay. If bound residue formation was evidenced, it never exceeded 2% of the initial amount of CT. To directly investigate this photoaddition reaction, we irradiated *n*-heptane solutions of CT in the presence of isoprene. No adduct formation was detected by GC-MS. In literature data, CT has also been proposed to form adducts in solution of pure methanol or ethanol.³⁰ In this study, the addition of alcohol to *n*-heptane in proportions of up to 5% did not lead to the formation of adducts.

Mechanism of *r*Reaction. Laser flash photolysis experiments have given evidence of the formation of a CT triplet excited state, and the experiments regarding energy transfer to anthracene have shown that the intersystem crossing quantum yield is high ($\Phi_{ISC} > 0.7$). Similar values were reported for polychlorobenzenes in cyclohexane.³¹ Moreover, we demonstrated that there is also an efficient energy transfer on oxygen with a singlet-oxygen quantum yield close to unity. Thus, most of CT triplet excited state is deactivated in aerated solution, explaining the low CT quantum yield of photodegradation ($\Phi_{deg} = (2 \pm 0.2) \times 10^{-2}$). Because the CT triplet state is very efficiently populated, one can postulate that the photochemical reactions proceed from it.

Photoproduct identification shows that the main reaction path is a reductive dechlorination. The photolysis of aryl chlorides has been widely studied because of their environmental significance,^{32,33} and several paths for the reductive photodechlorination have been proposed.^{30,31,34,35} The homolytic cleavage of the C–Cl bond may occur (path a, scheme 1). Alternatively, the reaction may be initiated by an electron transfer by a H-donor molecule followed by a proton transfer to form two radicals (path b, scheme 1).^{34,35} The presence of the cyano substituent, which has

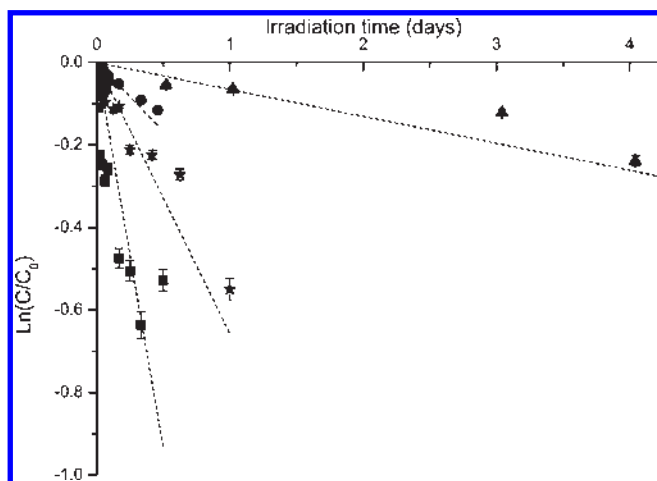


Figure 4. Phototransformation of chlorothalonil on paraffin wax under simulated sunlight irradiation (Suntest 500 W/m²) as a function of irradiation time. Chlorothalonil surface concentration is set to 500 g/ha, it is either ▲ deposited pure, ■ in addition with a spreading agent Synperionic 10/6, ● in a commercial formulation, ★ in addition with nonylphenol. The dashed lines represent the first-order fitted decays. The error bars represent the standard deviations based on three replicates.

a strong electro-withdrawing effect, may favor the latter path.^{36,37} To test this alternative pathway, we investigated the influence of phenol on the triplet excited-state lifetime by laser flash photolysis. The presence of phenol within the concentration range 3×10^{-4} to 2×10^{-3} M actually reduced the triplet lifetime in air-saturated *n*-heptane. The rate constant of the reaction was estimated to be $k_{RH} = 1.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. These considerations lead us to assess that the path b is possible. The products resulting from the attack of the chlorine radical have not been detected by GC-MS. In the experiment with phenol, the chlorophenol is probably too photoreactive to accumulate in the solution,²³ but we could detect phenoxyphenol, which confirms a radical mechanism. The mechanism is proposed in Scheme 1.

Photodegradation on Paraffin Wax. Photochemical processes occurring at the surface of crop leaves, vegetables or fruits after spraying were studied using a previously established laboratory procedure on model wax films.^{20,38} Pure or formulated CT decays follow pseudofirst-order kinetics with correlation values higher than 0.65 (R^2 , Figure 4). Pure CT presents a photodegradation rate constant (k_{deg}) of $(6.5 \pm 2) \times 10^{-2} \text{ d}^{-1}$ ($R^2 = 0.77$). This value corresponds to a photolysis half-life of about ten days under continuous irradiation. Formulated CT photoreactivity is higher with a photolysis half-life of two days ($k_{deg} = (0.33 \pm 0.17) \text{ d}^{-1}$, $R^2 = 0.7$). This photoreactivity increase induced by the additives has already been observed on wax films^{20–22} but is difficult to rationalize because formulations compositions are unknown. The addition of a classically used adjuvant from the family of synthetic alcohol ethoxylate (Synperionic 10/6) has also an accelerating effect on CT photolysis (Table 2). Such additives allow a better spreading of the molecule at the film surface, resulting in a better light absorption and consequently an increased photoreactivity. Additionally, the experiments performed in *n*-heptane have shown that CT photoreduction is enhanced by the addition of H-donor molecules like phenol. The commercial formulations are usually constituted of alcoholic functionalities or other good hydrogen-donor constituents that could have the same effect. To further demonstrate this effect, we prepared a mixture of

Table 2. Chlorothalonil Rate Constant of Photodegradation on Paraffin Wax (k_{deg}) Measured in the Suntest Reactor at 500 W m⁻² ^b with Addition of Various Additives^a

	rate constant
pure chlorothalonil	$k_{deg} = 0.065 \pm 0.02 \text{ d}^{-1}$
chlorothalonil + nonyl phenol	$k_{deg} = 0.65 \pm 0.2 \text{ d}^{-1}$
chlorothalonil + with a synthetic alcohol ethoxylate Synperionic 10/6 ^f	$k_{deg} = 1.8 \pm 0.2 \text{ d}^{-1}$
photolysis of formulated chlorothalonil ^g	$k_{deg} = 0.33 \pm 0.17 \text{ d}^{-1}$
photolysis of formulated chlorothalonil extrapolated to outdoor conditions	$^{ext}k_{deg} = 0.14 \text{ d}^{-1}$
CT volatilization from crops ^d	$k_{vol} = 0.007 \text{ d}^{-1}$
CT penetration in apple fruit ^e	$k_{pen} = 0.11 \text{ d}^{-1}$

^a The extrapolated rate constant of photodegradation of formulated chlorothalonil to outdoor conditions includes the alternation of night and day ($^{ext}k_{deg}$).^c Chlorothalonil rate constant of volatilization measured in the field (k_{vol})^d and chlorothalonil rate constant of penetration (k_{pen})^e. ^b Corresponding to an irradiance of 51 W m⁻² between 300 and 400 nm. ^c Average irradiance of 22 W m⁻² in central Europe in summer time conditions⁴⁴. ^d Measured in a wheat field⁴². ^e Measured into apple fruit under laboratory conditions with radiolabeled chlorothalonil⁴⁰. ^f A synthetic alcohol ethoxylate used as a spreading agent. ^g Commercial formulation Fongil.

pure CT and nonylphenol for application on wax films. An increase of photoreactivity by a factor of about nine was observed ($k_{deg} = (0.65 \pm 0.2) \text{ d}^{-1}$, $R^2 = 0.75$).

Environmental Implications. CT is described to provide a rather long protective action at the plant surfaces, and the typical recommended spray interval is 10–14 days³⁹. CT dislodgeable residues are defined as the part obtained by soaking the leaves in an organic solvent for a few seconds, corresponding to the portion present at the leaf surface or in the upper layer of the cuticle. The dissipation of dislodgeable foliar CT on cranberry in a bog followed first-order kinetics with an estimated half-life of 12.7 days.⁴⁰ CT dissipation from tomatoes in a greenhouse presents a half-life of dissipation of 8.8 days,⁴¹ whereas field dissipation on the surface banana leaves under tropical conditions had half-lives of 3.9 days.⁴² In the following discussion we are going to compare the different path of dissipation.

The CT penetration into the plant rate is estimated to be slow. Experiments with radio-labeled CT measured 46% and 29.4% of dislodgeable radioactive residue in apple fruit after 5 days and 12 days, respectively.⁴³ CT is indeed described as a nonsystemic foliar fungicide with a low penetration rate inside the leaves.⁴⁴ Based on these results, the penetration rate coefficient is $k_{pen} = 0.11 \text{ d}^{-1}$ (half-life 6.3 days).

CT volatilization was measured in a wheat field.⁴⁵ The cumulated emission from the field reached 0.6% and 4.9% of the application dose after 31 h and one week, respectively. Based on these results, the rate coefficient is $k_{vol} = 0.007 \text{ d}^{-1}$. These measurements are in good agreement with another study in which the CT volatilization from crop canopies has been modeled and estimated to about 5% of the application dose after a week.⁴⁶

The sunlight irradiance between 300 and 400 nm in central Europe in summertime conditions averages 22 W m⁻² over the 24 h of a day,⁴⁷ whereas the tests in the photosimulator are

performed at a constant irradiance of 51 W m^{-2} . We can thus extrapolate the formulated CT rate constant of photodegradation to outdoor conditions: $^{\text{ext}}k_{\text{deg}} = 0.14 \text{ d}^{-1}$. This value corresponds to an extrapolated photolysis half-life of 5 days. This value is the first extrapolated datum regarding the CT photolysis rate at a plant surface.

The CT rate of photodegradation and rate of penetration are of about the same order of magnitude, while volatilization is much lower (table 2). CT dissipation from crops is then ruled by both photodegradation and penetration. The relative importance of the two paths probably depends on meteorological factors and on physicochemical characteristics of the cuticle of the crop. It is interesting to note that while CT fate in the aquatic media is reported to be ruled by microbial degradation and photolysis is a minor path,¹⁵ this study implies that CT photolysis on crops is one of the predominant processes. This first approach invites photochemical investigation on real system; a first step would be the use of plants under controlled conditions and finally the undertaking of a field monitoring.

Additionally CT has the ability to produce singlet oxygen very efficiently (near 100%). The oxidant power of singlet oxygen could have some impact on the constituents of crop leaves. Singlet oxygen produced by chlorothalonil could also take place in its fungicide activity; like some phototoxic phytoalexins implied into plant defense mechanisms.

■ ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. Additional information as noted in the text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: alexandra.ter-halle@univ-bpclermont.fr.

■ REFERENCES

- (1) *Environmental Protection and Toxic Substances; Pesticide Fact Sheet, Name of Chemical: Azoxystrobin*; United States Office of Prevention, Pesticides: Arlington, VA, 1997.
- (2) Rabson, R.; Plimmer, J. R. Photoalteration of pesticides—Summary of workshop. *Science* **1973**, *180* (4091), 1204–1205.
- (3) ter Halle, A.; Piquet, A.; Richard, C. An actual scenario that demonstrates sulcotrione photodegradation on maize leaves after spraying. *Environ. Chem.* **2007**, *4* (4), 256–259.
- (4) Green, J. Adjuvant outlook for pesticides. *Pestic. Outlook* **2000**, *11* (5), 196–199.
- (5) Sherrarda, R. M.; Bearrb, J. S.; Murray-Guldec, C. L.; Rodgers, J. H.; Shahd, Y. T. Feasibility of constructed wetlands for removing chlorothalonil and chlorpyrifos from aqueous mixtures. *Environ. Pollut.* **2004**, *127*, 385–394.
- (6) Kiely, T.; Donaldson, D.; Grube, A. *Pesticides Industry Sales and Usage: 2000 and 2001 Market Estimates*; U.S. EPA: Washington, DC, 2004.
- (7) Keinatha, A. P.; Holmesb, G. J.; Evertsc, K. L.; Egeld, D. S.; Langston, D. B. Evaluation of combinations of chlorothalonil with azoxystrobin, harpin, and disease forecasting for control of downy mildew and gummy stem blight on melon. *Crop Prot.* **2007**, *26*, 83–88.
- (8) Putnam, R. A.; Nelson, J. O.; Clark, J. M. The persistence and degradation of chlorothalonil and chlorpyrifos in a cranberry bog. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (1), 170–176.
- (9) Mozzachio, A. M.; Rusiecki, J. A.; Hoppin, J. A.; Mahajan, R.; Patel, R.; Beane-Freeman, L.; Alavanja, M. C. Chlorothalonil exposure

and cancer incidence among pesticide applicator participants in the agricultural health study. *Environ. Res.* **2008**, *108* (3), 400–403.

(10) Kern, S.; Fenner, K.; Singer, H. P.; Schwarzenbach, R. P.; Hollender, J. Identification of transformation products of organic contaminants in natural waters by computer-aided prediction and high-resolution mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43* (18), 7039–7046.

(11) Yamamoto, A.; Miyamoto, I.; Kitagawa, M.; Moriwaki, H.; Miyakoda, H.; Kawasaki, H.; Arakawa, R. Analysis of chlorothalonil by liquid chromatography/mass spectrometry using negative-ion atmospheric pressure photoionization. *Anal. Sci.* **2009**, *25* (5), 693–697.

(12) *The Agrochemical Handbook*; Unwin Brothers limited Old Working, Royal Society of chemistry: Surrey, UK, 1991.

(13) Regitano, J. B.; Tornisiello, V. L.; Lavorenti, A.; Pacovsky, R. S. Transformation pathways of C-14-chlorothalonil in tropical soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2001**, *40* (3), 295–302.

(14) Carlo-Rojas, Z.; Bello-Mendoza, R.; Figueroa, M. S.; Sokolov, M. Y. Chlorothalonil degradation under anaerobic conditions in an agricultural tropical soil. *Water Air Soil Poll.* **2004**, *151* (1–4), 397–409.

(15) Penuela, G. A.; Barcelo, D. Photodegradation and stability of chlorothalonil in water studied by solid-phase disk extraction, followed by gas chromatographic techniques. *J. Chromatogr., A* **1998**, *823* (1–2), 81–90.

(16) Sakkas, V. A.; Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A. Study of chlorothalonil photodegradation in natural waters and in the presence of humic substances. *Chemosphere* **2002**, *48* (9), 939–945.

(17) Szalkowski, M. B.; Stallard, D. E. Effect of Ph on hydrolysis of chlorothalonil. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *25* (1), 208–210.

(18) Kwon, J. W.; Armbrust, K. L. Degradation of chlorothalonil in irradiated water/sediment systems. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (10), 3651–3657.

(19) Avila, L. A.; Massey, J. H.; Senseman, S. A.; Armbrust, K. L.; Lancaster, S. R.; McCauley, G. N.; Chandler, J. M. Imazethapyr aqueous photolysis, reaction quantum yield, and hydroxyl radical rate constant. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (7), 2635–2639.

(20) ter Halle, A.; Drncova, D.; Richard, C. Phototransformation of the herbicide sulcotrione on maize cuticular wax. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40* (9), 2989–2995.

(21) Eyheraguibel, B.; ter Halle, A.; Richard, C. Photodegradation of bentazon, clopyralid, and triclopyr on model leaves: Importance of a systematic evaluation of pesticide photostability on crops. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (5), 1960–1966.

(22) Lavieille, D.; ter Halle, A.; Richard, C. Understanding mesotrione photochemistry when applied on leaves. *Environ. Chem.* **2008**, *5* (6), 420–425.

(23) Bonnichon, F.; Richard, C. Phototransformation of 3-hydroxybenzonitrile in water. *J. Photochem. Photobiol., A* **1998**, *119* (1), 25–32.

(24) Ohyashiki, T.; Nunomura, M.; Katoh, T. Detection of superoxide anion radical in phospholipid liposomal membrane by fluorescence quenching method using 1,3 diphenylisobenzofuran. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1421*, 131–139.

(25) Calvert, J. C. Pitts, J. N. *Photochemistry*; John Wiley and Sons: London, 1966.

(26) Millet, M.; Palm, W. U.; Zetzsch, C. Abiotic degradation of halobenzonitriles: Investigation of the photolysis in solution. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1998**, *41* (1), 44–50.

(27) Battino, R.; Rettich, T. R.; Tominaga, T. The solubility of oxygen and ozone in liquids. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1983**, *12* (2), 163–178.

(28) Chaves, A.; Shea, D.; Daneshmand, D. Analysis of chlorothalonil and degradation products in soil and water by GC/MS and LC/MS. *Chemosphere* **2008**, *71* (4), 629–638.

(29) Jahn, C.; Schwack, W. Determination of cutin-bound residues of chlorothalonil by immunoassay. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (3), 1233–1238.

(30) Samanta, S.; Kole, R. K.; Ganguly, L. K.; Chowdhury, A. Photochemical transformation of the fungicide chlorothalonil by ultra violet radiation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1997**, *59* (3), 367–374.

- (31) Kawamura, Y.; Takeda, M.; Uchiyama, M. Photolysis of chlorothalonil in benzene. *J. Pestic. Sci.* **1978**, *3* (4), 397–400.
- (32) Izadifard, M.; Langford, C. H.; Achari, G. Photocatalytic dechlorination of polychlorinated biphenyls using leuco-methylene blue sensitization, broad spectrum visible lamps, or light emitting diodes. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44* (23), 9075–9079.
- (33) Bendig, P.; Vetter, W. Photolytical transformation rates of individual polybrominated diphenyl ethers in technical octabromo diphenyl ether (DE-79). *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44* (5), 1650–1655.
- (34) Bunce, N. J. Photolysis of aryl chlorides with aliphatic-amines. *J. Org. Chem.* **1982**, *47* (10), 1948–1955.
- (35) Freccero, M.; Fagnoni, M.; Albini, A. Homolytic vs heterolytic paths in the photochemistry of haloanilines. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (43), 13182–13190.
- (36) Neunteufel, R. A.; Arnold, D. R. Radical ions in photochemistry. I. The 1,1-diphenylethylene cation radical. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95* (12), 4080–4081.
- (37) Bonnichon, F.; Grabner, G.; Guyot, G.; Richard, C. Photochemistry of substituted 4-halogenophenols: effect of a CN substituent. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, No. 6, 1203–1210.
- (38) Lavielle, D.; ter Halle, A.; Bussière, P. O.; Richard, C. Effect of a spreading adjuvant on mesotrione photolysis on wax films. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (20), 9624–9628.
- (39) Elliott, V. J.; Spurr, H. W. Temporal dynamics of chlorothalonil residues on peanut foliage and the influence of weather factors and plant-growth. *Plant. Dis.* **1993**, *77* (5), 455–460.
- (40) Putnam, R. A.; Nelson, J. O.; Clark, J. M. The persistence and degradation of chlorothalonil and chlorpyrifos in a cranberry bog. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (1), 170–176.
- (41) Kurz, M. H. S.; Goncalves, F. F.; Adaime, M. B.; da Costa, I. E. D.; Primel, E. G.; Zanella, R. A gas chromatographic method for the determination of the fungicide chlorothalonil in tomatoes and cucumbers and its application to dissipation studies in experimental greenhouses. *J. Brazil. Chem. Soc.* **2008**, *19* (6), 1129–1135.
- (42) Chaves, A.; Shea, D.; Cope, W. G. Environmental fate of chlorothalonil in a Costa Rican banana plantation. *Chemosphere* **2007**, *69*, 1166–1174.
- (43) Gilbert, M. Fate of chlorothalonil in apple foliage and fruit. *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24* (5), 1004–1007.
- (44) Caux, P. Y.; Kent, R. A.; Fan, G. T.; Stephenson, G. L. Environmental fate and effects of chlorothalonil: A Canadian perspective. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **1996**, *26* (1), 45–93.
- (45) Carole, B.; Rousseau-Djabri, M. F.; Benjamin, L.; Brigitte, D.; Dominique, F.; Olivier, B.; Barriuso, E. Fungicide volatilization measurements: Inverse modeling, role of vapor pressure, and state of foliar residue. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44* (7), 2522–2528.
- (46) Leistra, M.; Van Den Berg, F. Volatilization of parathion and chlorothalonil from a potato crop simulated by the PEARL model. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41* (7), 2243–2248.
- (47) Frank, R.; Klopffer, W. Spectral solar photon irradiance in central-europe and the adjacent north-sea. *Chemosphere* **1988**, *17* (5), 985–994.

Supporting Material

“Photoreduction of chlorothalonil fungicide on plant leaf models”

S. Monadjemi^{1,2}, M. el Roz^{1,2}, C. Richard^{1,2}, A. ter Halle^{1,2*}

1. Quantum yield of singlet oxygen production measurement

The quantum yield of singlet oxygen production by chlorothalonil was measured using perinaphtenone as a reference.

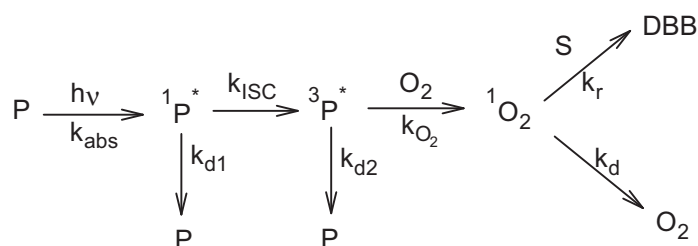


Figure S1: Scheme of photosensitized oxidation of the probe

Where, P is the photosensitizer (here perinaphtenone or chlorothalonil) and S the probe (1,3-diphenyl isobenzofuran) reacting with $^1\text{O}_2$. DBB (o-dibenzoylbenzene) is the transformation product of the probe. The range of concentrations used in our experiments is 10^{-5} to 10^{-6} M for the probe S and 5×10^{-6} M for perinaphtenone or chlorothalonil.

I_a : the number of photons absorbed by the sensitizer (photons $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$)

k_{abs} : rate constant of photon absorption by P (s^{-1})

k_{d1} : deactivation rate constant of $^1\text{P}^*$ (s^{-1})

k_{d2} : deactivation rate constant of $^3\text{P}^*$ (s^{-1})

k_{ISC} : rate constant of internal system crossing (s^{-1})

k_{O_2} : reaction rate constant of $^3\text{P}^*$ with O_2 ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)

k_r : reaction rate constant of S with $^1\text{O}_2$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)

k_d : deactivation rate constant of $^1\text{O}_2$ (s^{-1})

Using the hypothesis of the steady state for $^1\text{P}^*$ and $^3\text{P}^*$, one gets:

$$\frac{d[{}^1\text{P}^*]}{dt} = 0 = I_a - k_{\text{ISC}}[{}^1\text{P}^*] - k_{d1}[{}^1\text{P}^*] \quad (1)$$

$$\frac{d[{}^3P^*]}{dt} = 0 = k_{ISC}[{}^1P^*] - k_{O_2}[O_2][{}^3P^*] - k_{d2}[{}^3P^*] \quad (2)$$

The quantum yield of singlet oxygen production is expressed as followed:

$$\phi_{SO} = \frac{\text{number of } {}^1O_2 \text{ molecules formed}}{\text{number photons received per unit of surface}}$$

$$\text{We therefore have: } \phi_{SO} = \frac{[{}^1O_2]}{I_a} = \frac{k_{O_2}[O_2][{}^3P^*]}{I_a} \quad (3)$$

$$\text{Using equation (3) and (2)} \quad \phi_{SO} = \frac{k_{O_2} \cdot [O_2]}{I_a} \cdot \frac{k_{ISC}[{}^1P^*]}{k_{O_2}[O_2] + k_{d2}}$$

$$\text{then using equation (1)} \quad \phi_{SO} = \frac{k_{O_2}[O_2]k_1}{I_a(k_{O_2}[O_2] + k_{d2})} \cdot \frac{I_a}{k_{ISC} + k_{d1}}$$

$$\phi_{SO} = \frac{k_{O_2}[O_2] \cdot k_{ISC}}{I_a \cdot (k_{O_2}[O_2] + k_{d2})} \cdot \frac{I_a}{k_{ISC} + k_{d1}} = \boxed{\frac{k_{ISC}}{k_{ISC} + k_{d1}} \cdot \frac{k_{O_2}[O_2]}{(k_{O_2}[O_2] \cdot k_{d2})}} \quad (4)$$

We make the hypothesis of the steady state for $[{}^1O_2]$.

$$\frac{d[{}^1O_2]}{dt} = 0 = k_{O_2}[O_2][{}^3P^*] - k_d[{}^1O_2] - k_r[S][{}^1O_2] \quad (5)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = k_r[S][{}^1O_2]$$

$$\text{Using equation (5) we have } \frac{d[S]}{dt} = k_r[S] \cdot \frac{k_{O_2}[O_2][{}^3P^*]}{k_d + k_r[S]}$$

Using equations (2), (1) and (4)

$$\frac{d[S]}{dt} = k_r[S] \cdot \frac{k_{O_2}[O_2]}{k_d + k_r[S]} \cdot \frac{k_{ISC}[{}^1P^*]}{k_{O_2}[O_2] + k_{d2}}$$

$$\frac{d[S]}{dt} = k_r[S] \cdot \frac{k_{O_2}[O_2]}{k_d + k_r[S]} \cdot \frac{k_{ISC}}{k_{O_2}[O_2] + k_{d2}} \cdot \frac{I_a}{k_{ISC} + k_{d1}}$$

$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{k_r[S]}{k_d + k_r[S]} \cdot \phi_{SO} \cdot I_a$$

The quantum yield of the probe (S) is expressed as followed:

$$\phi_S = \frac{\text{number of } S \text{ molecules converted to DBB}}{\text{number photons received per unit of surface}}$$

We therefore have $\phi_S = \frac{d[S]}{I_a}$

Thus, we can express ϕ_S as: $\phi_S = \phi_{SO} \cdot \frac{k_r[S]}{k_d + k_r[S]}$

As $[S]$ is small, $k_r[S]$ can be neglected behind k_d , and the quantum yield of S disappearance is linked to the quantum yield of singlet oxygen production according to:

$$\phi_S = \phi_{SO} \cdot \frac{k_r}{k_d} \cdot [S]$$

Some values of rate constants k_r and k_d were obtained from literature (table SI 1). Since rate constants depend strongly on the solvent and no values are available in heptane, we performed experiments to estimate the ratio k_r/k_d using perinaphtenone as a sensitizer (figure SI 2).

Table SI 1 : Reaction rate constants k_r and k_d obtained from literature data for perinaphtenone

solvent	k_r ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	k_r / k_d	reference
benzene	6.6×10^8	$(4.2 \pm 0.9) \times 10^4$	15714	1,2
cyclohexanol	2.1×10^8	$(6.3 \pm 0.9) \times 10^4$	3333	2,3
cyclohexane		$(5.9 \pm 0.2) \times 10^4$		4
n-hexane	3.9×10^9	$(5.9 \pm 0.2) \times 10^4$	66667	5

In Figure SI 2, we have plotted ϕ_s against $[S]$. As expected from equation given below, the plot is linear. The slope is equal to 8730 M^{-1} . Taking the value ${}^P\phi_{SO}=0.97$ in n-heptane⁶, we estimate $k_r/k_d = 9000 \text{ M}^{-1}$ in n-heptane.

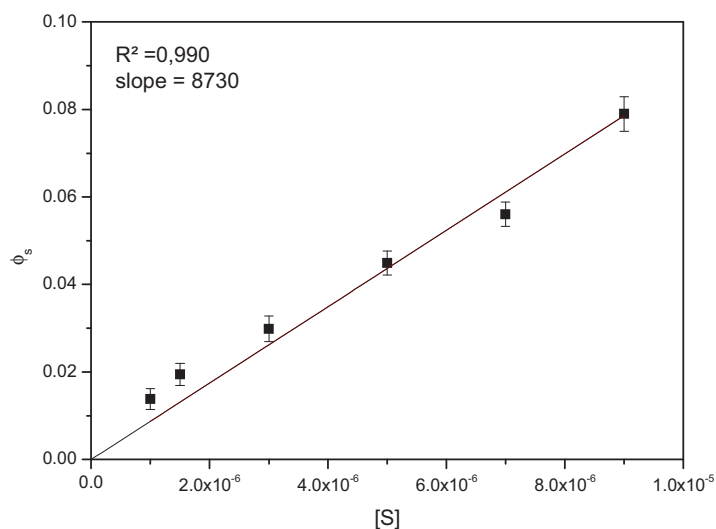


Figure S2: $\phi_s = f([S])$ using perinaphtenone as the sensitizer

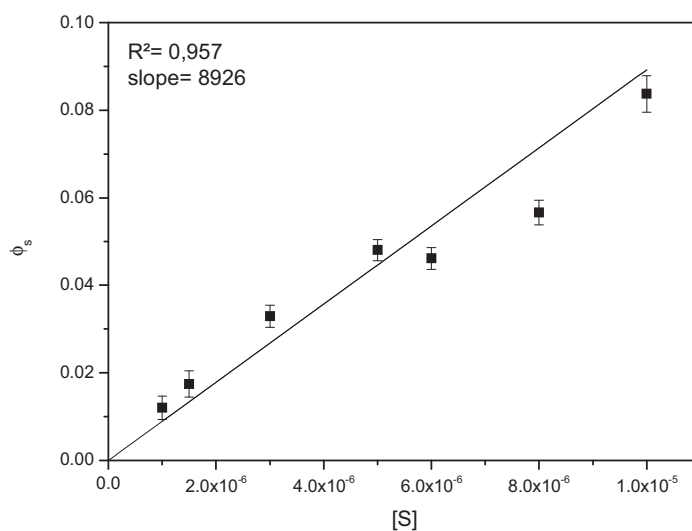


Figure S3 : $\phi_s = f([S])$ using chlorothalonil as the sensitizer

The linear regression of Figure SI 3 gives a slope of 8926. Taking the previous value for $k_r/k_d = 9000 \text{ M}^{-1}$, we obtain ${}^{CT}\phi_{SO} = 0.99$

2. Use of DPBF as the probe

The reaction of the probe, diphenylisobenzofuran, with oxygen singlet leads first to an intermediate which is then converted to o-dibenzoylbenzene. The reaction is described in figure SI 4⁷. DPBF concentration was followed by fluorescence, $\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 454 \text{ nm}$ using the method described previously⁸. DBB is not fluorescent and thus does not interfere with DPBF fluorescence signal.

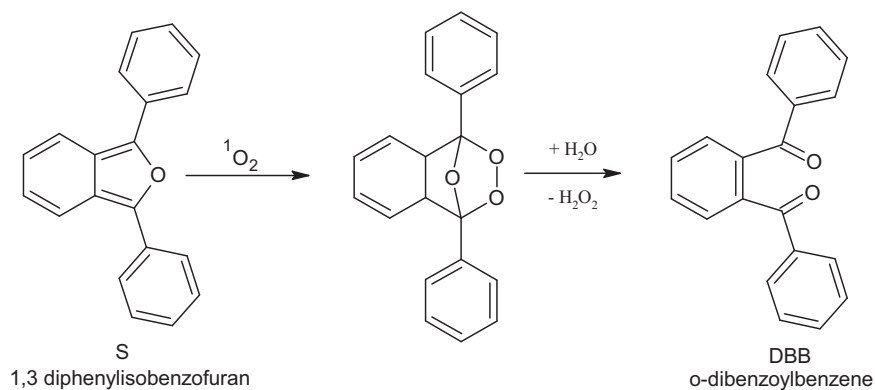


Figure S4: reaction of the probe with singlet oxygen

3. GC-MS data:

The GC-MS analyses of irradiated solutions of chlorothalonil in air-saturated n-heptane show the formation of 3 photoproducts (mass spectra shown in figure SI 5).

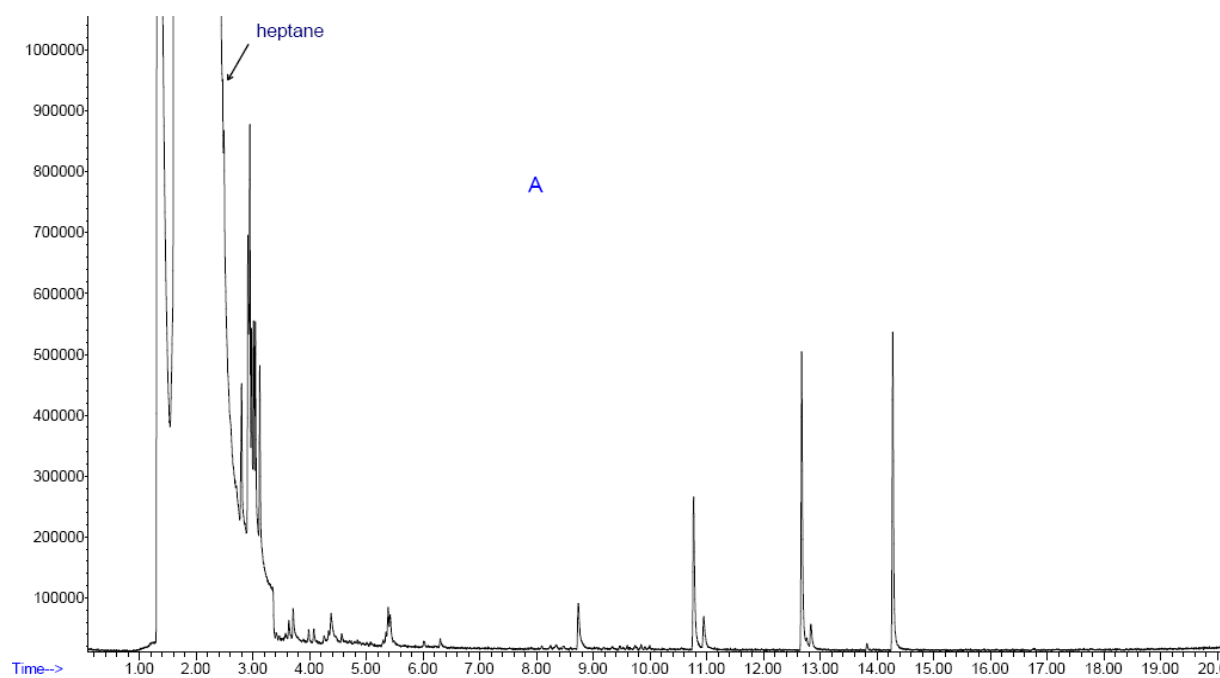


Figure S5: Chromatogram of an irradiated solution of chlorothalonil in n-heptane.

The first photoproduct with a retention time of 8.7 min is the chloro-1,3-dicyanobenzene (figure S 6).

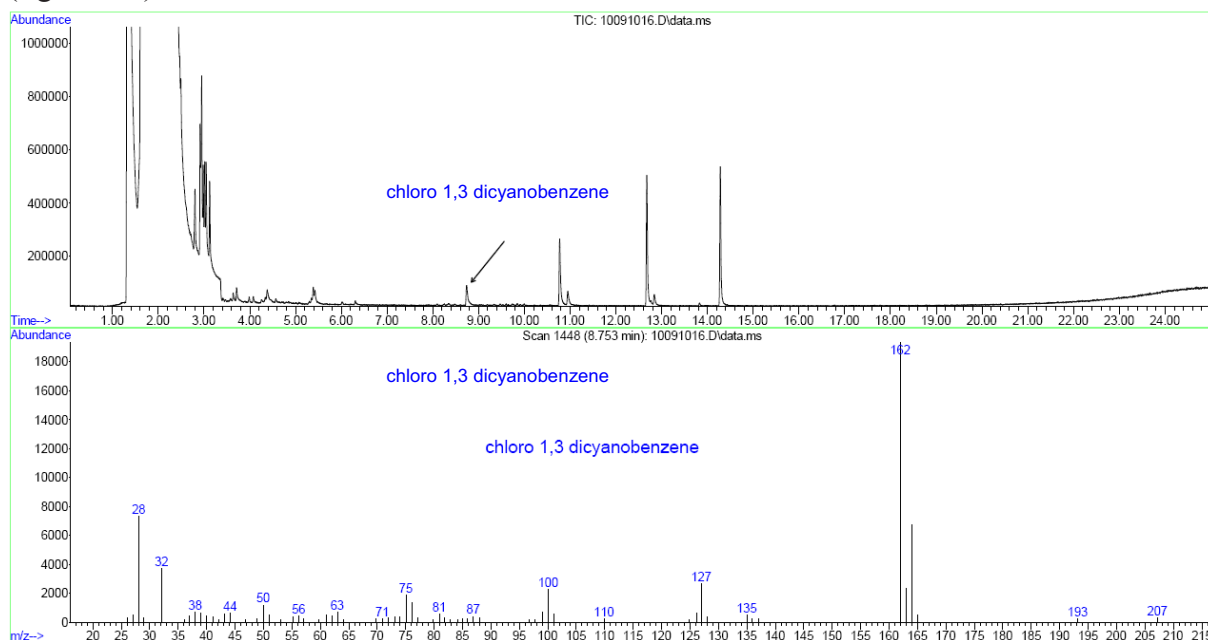


Figure S6: Mass spectra of chloro-1,3-dicyanobenzene.

The second identified photoproducts are the congeners dichloro-1,3-dicyanobenzenes (figure S7).

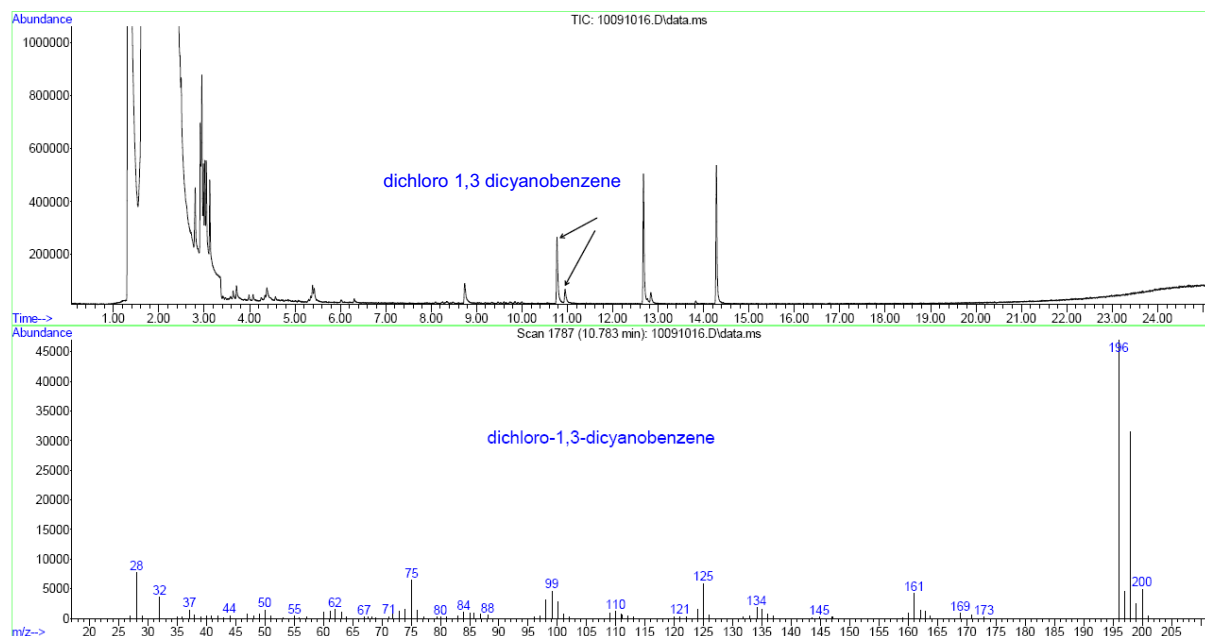


Figure S7: Mass spectra of the dichloro-1,3-dicyanobenzene congeners.

The mono dechlorinated chlorothalonil isomers have retention time around 12 minutes, their mass spectra is given in figure S8.

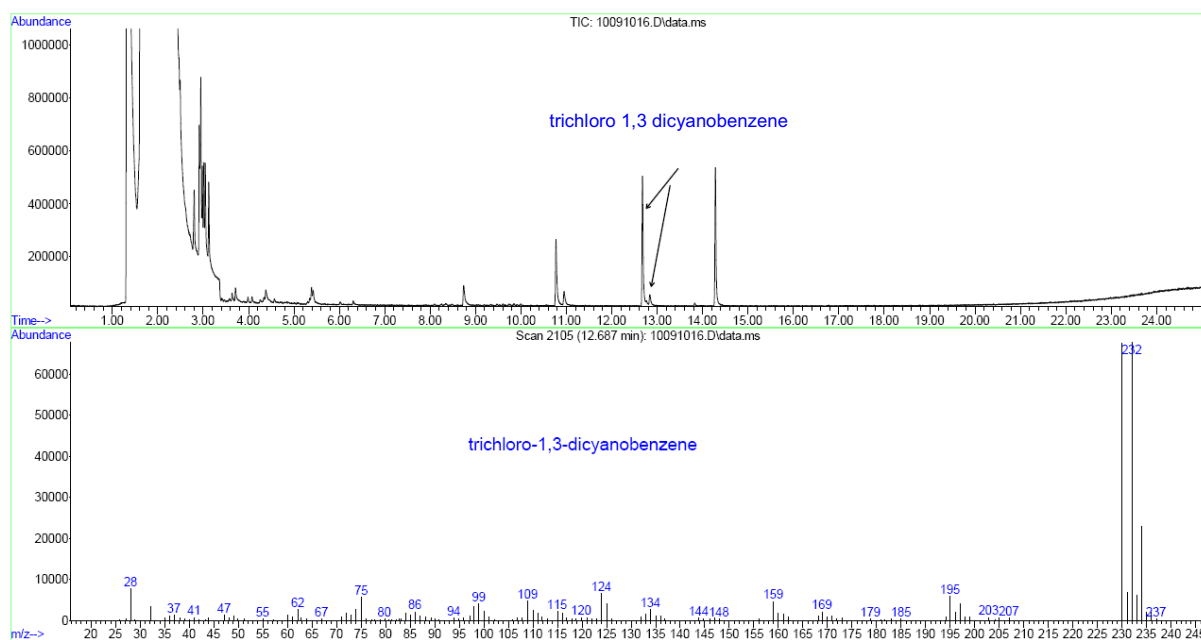


Figure S8: Mass spectra of trichloro-1,3-dicyanobenzene.

In figure S9 is reported the mass spectra of parent compound.

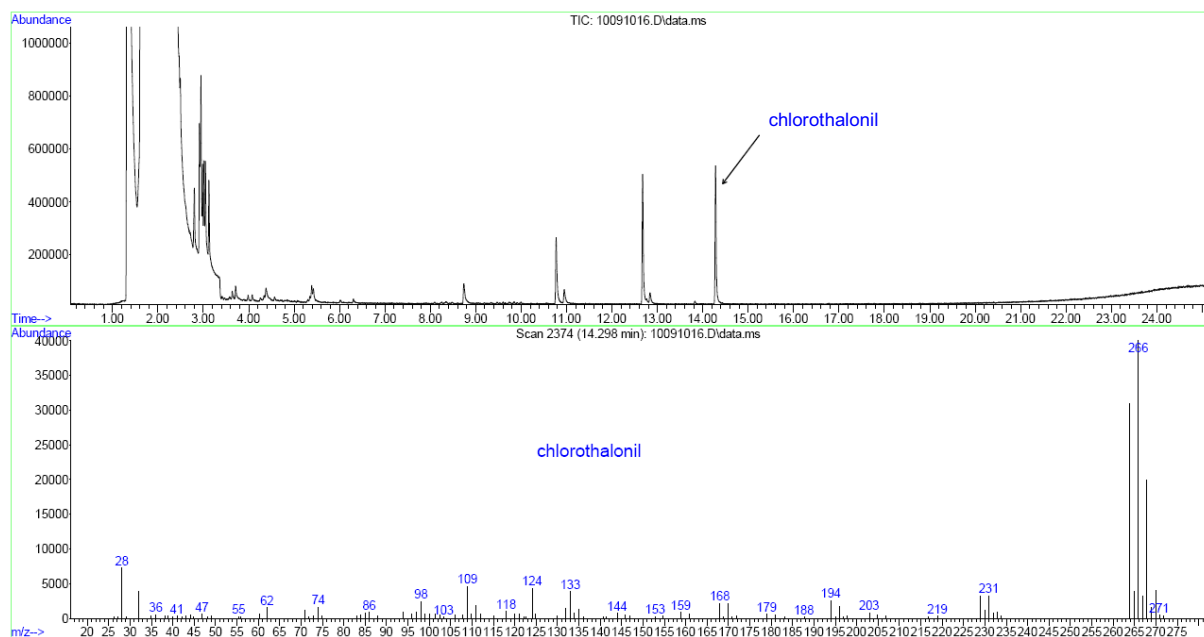


Figure S9: Mass spectra of chlorothalonil

The chromatograms show two isomers of dichloro-1,3-dicyanobenzene and two isomers of tri-1,3-dicyanobenzene.

4. Quenching of CT triplet by phenol

The quenching of CT triplet by phenol was monitored in air-saturated n-heptane. Thus, in the plot k_{obs} against [phenol] (Figure S10), the intercept is the sum of the first order rate constant of triplet deactivation and triplet quenching by oxygen. The slope is k_{RH} , the bimolecular rate constant of triplet scavenging by phenol.

We obtained $k_{\text{RH}} = (1.83 \pm 0.14) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ with $R^2 = 0.994$

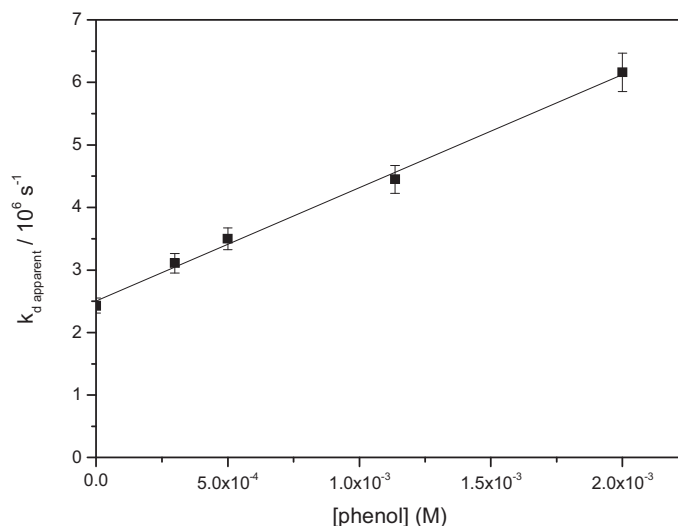


Figure S10: Quenching of the CT triplet excited state by phenol

5. Energy transfer from CT triplet to anthracene:

To confirm that the transient species observed is the triplet and to measure the quantum yield of inter-system crossing, we used anthracene as an energy acceptor. The figure S11 shows the 320-nm absorbance variation with time upon laser excitation of CT (10^{-4} M), anthracene ($4 \times 10^{-4} \text{ M}$) and CT+ anthracene solutions. The lifetime of triplet CT is faster in the presence of anthracene than in the absence of anthracene showing that anthracene has reacted with the CT triplet.

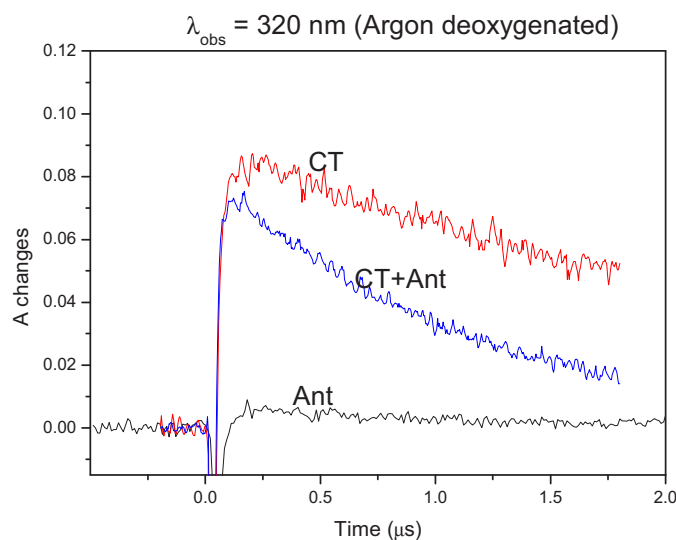


Figure S11: Absorbance decay from CT alone, anthracene alone and mixture CT + anthracene at 320-nm.

This second graph (figure S10) shows that the formation of the triplet of anthracene at 421 nm. The absorbance is drastically more important in the system CT+ anthracene than in the solution of anthracene alone. This evidences the energy transfer between triplet CT and ground state anthracene.

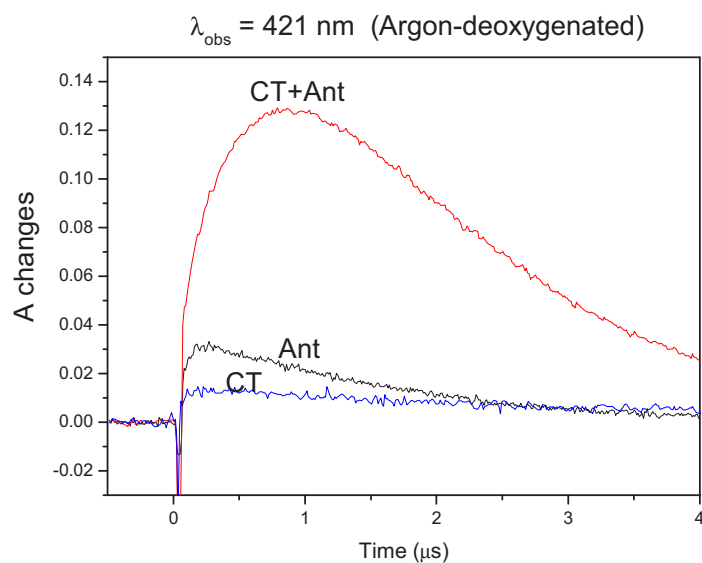


Figure S12: Anthracene triplet formation monitoring

To measure the quantum of inter system crossing of CT, we made as follows. We measured the product $\epsilon_T \times \phi_{ISC}$ for anthracene alone using peroxodisulfate as actinometer ($\epsilon_T \times \phi_{ISC} = 1880 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 450 nm). We found $33600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 421 nm at 0.2 microsecond. Then one measured the $\epsilon_T \times \phi_{ISC}$ of anthracene in the mixture CT+anthracene from absorbances monitored at 1 microsecond. We found $31100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 421 nm. Using that ϕ_{ISC} for anthracene is equal to 0.71 (9) and using the relative absorbances of anthracene and CT in the mixture, one finally got that ϕ_{ISC} for CT is around 0.7

References

1. Merkel, P. B. and Kearns, D. R. Remarkable solvent effects on the lifetime of $^1\Delta_g$ oxygen. *Journal of American Chemical Society* **1972**, 94 (3), 1029-1030.
2. Stevens, B., Ors, J. A., Pinsky, M. L. The photo-peroxidation of unsaturated organic molecules. O_2 $^1\Delta_g$ acceptor re-encounter probabilities. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, 27 (2), 157-160.
3. Young, R. H. and Brewer, D. R. *Singlet Oxygen, reactions with organic compounds and polymers*, Ranby, B.; Rabek, J. F. Eds.; John Wiley & sons: 1976.
4. Merkel, P. B. and Kearns, D. R. Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. An experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94 (21), 7244-7253.
5. Olmsted, J. and Karal, G. Iodine-sensitized phototransformation of singlet oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94 (10), 3305-3313.
6. Oliveros, E., Bossmann, S. H., Nonell, S., Mart, C., Heit, G., Tröscher, G., Neuner, A., Martinez, C., Braun, A. M. Photochemistry of the singlet oxygen [O_2] sensitizer perinaphthenone (phenalenone) in N,N'-dimethylacetamide and 1,4-dioxane. *New J. Chem.* **1999**, 85-93.
7. Howard, J. A. and Mendenhall, G. D. Autoxidation and Photooxidation of 1,3-diphenylisobenzofuran : A Kinetic and Product Study. *Can. J. Chem.* **1975**, 53 2199-2201.
8. Wozniak, M., Tanfani, F., Bertoli, E., Zolese, G., Apreaa, C., Antosiewicz, J. A new fluorescence method to detect singlet oxygen inside phospholipid model membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1082 94-100.
9. Murov, S. L.; Carmichael, I.; Hug, G. L. *Handbook of Photochemistry*, CRC Press: NY. 1993.

3.2 Expériences complémentaires

Données détaillées de la cinétique de photolyse de CT en solution

Les cinétiques de photodégradation du CT en solution sont montrées Figure III.4. Cette figure correspond aux valeurs des constantes de vitesse de premier ordre apparent données dans le tableau 1 de l'article ; y est rajoutée la cinétique de photolyse du CT en présence d'isoprène qui lui aussi accélère la phototransformation.

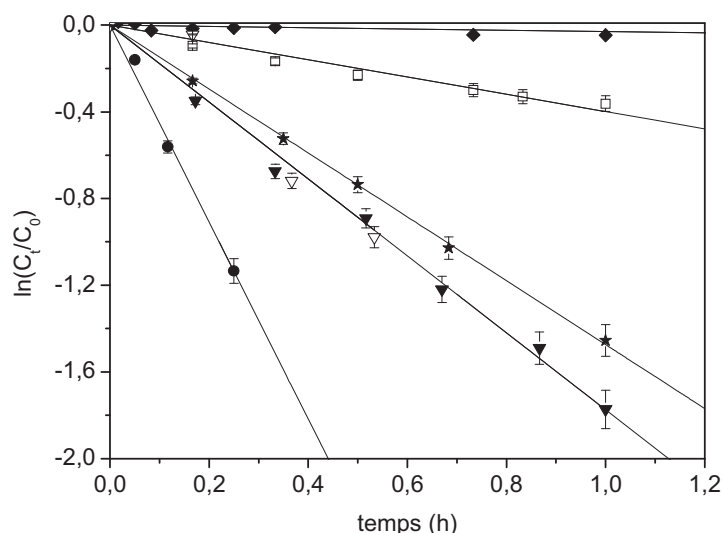


Figure III.4: Cinétique de dégradation du CT dans l'acétonitrile (◆) ; l'heptane (□) ; l'heptane + 5% d'isopropanol (★) ; l'heptane + 5% isoprène (▼) ; l'heptane + 2% phénol (▽) ; l'heptane désaéré (●).

On peut constater que le rendement quantique de photodégradation de CT est 20 fois plus faible dans l'acétonitrile que dans l'heptane (article - tableau 1). Ceci suggère fortement une réactivité entre l'état excité triplet du CT et l'heptane qui est un donneur d'H. Cette hypothèse est confirmée par l'ajout d'alcool dans le milieu. Comme le montre la Figure III.4, les cinétiques de photodégradation sont plus rapides dans l'heptane contenant 5% d'isopropanol ou 2% de phénol que dans l'heptane pur. Ceci correspond à une réduction de l'état excité triplet de CT par le biais d'un transfert d'atome H. L'isoprène contient également un groupement CH_3 susceptible d'induire la réduction du triplet.

Mesure de la constante de vitesse de réaction entre $^3\text{CT}^*$ et un donneur d'H

Pour mesurer la réactivité entre un donneur d'H et $^3\text{CT}^*$, du phénol a été ajouté à une solution de CT (10^{-4} M) préparée dans l'heptane. Le transitoire $^3\text{CT}^*$ est formé par excitation laser à 266 nm et sa disparition est suivie à 320 nm. Les cinétiques de disparition de $^3\text{CT}^*$ sont du premier ordre (Figure III.5) et la constante de vitesse de disparition du triplet (k) est relevée

pour chaque concentration de phénol (Figure III.5). La droite tracée en portant k en fonction de $[\text{phénol}]$ est donnée Figure SI 8 de l'article.

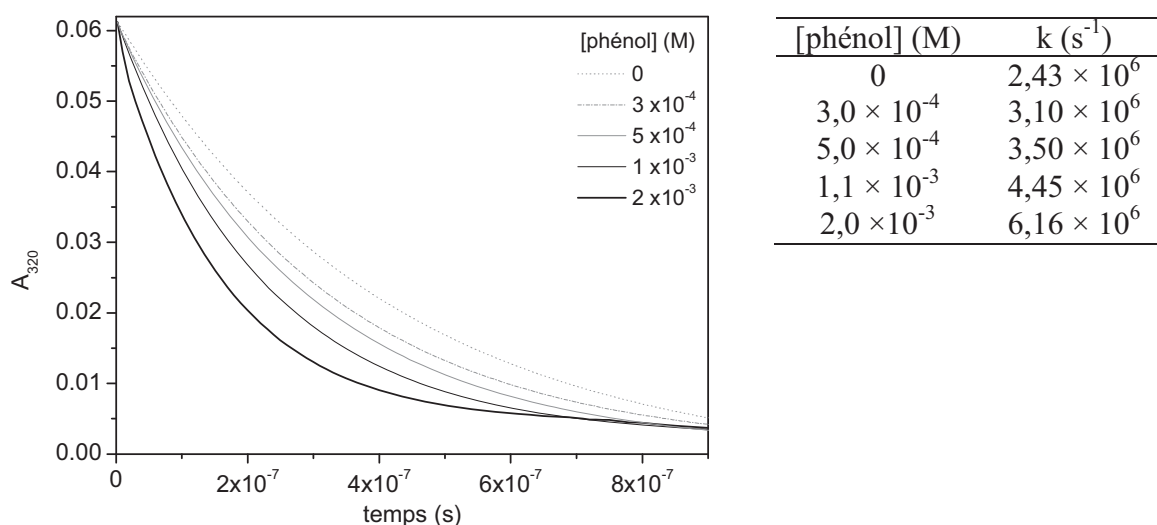


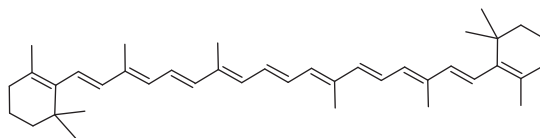
Figure III.5 : Disparition de $^3\text{CT}^*$ suivie à 320 nm dans des solutions de CT (10^{-4} M) contenant différentes concentrations de phénol. Heptane, milieu aéré.

Mesure de la volatilité et de la pénétration du CT

Par rapport aux résultats rapportés dans l'article, nous avons voulu nous assurer que la perte de CT n'était pas due à de la volatilisation ou pénétration dans la cire. Pour mesurer la volatilité, les expériences ont été réalisées dans des cristallisoirs en verre. Avec un niveau de confiance de 95% sur les rendements de récupération, aucune volatilité n'a été mesurée avec ou sans l'ajout de surfactant sur 2 jours. De même, la pénétration dans la cire est un processus lent de sorte que la pénétration de la substance active en présence ou en absence d'agent d'étalement est négligeable durant 4 jours dans nos conditions expérimentales.

Photodégradation de CT sur film de cire contenant du β -carotène

Pour compléter les études déjà réalisées, nous avons cherché à savoir quelle pourrait être l'influence de métabolites secondaires, initiateurs ou inhibiteurs de réaction. Les cires des plantes sont des mélanges complexes qui peuvent contenir des alcènes. Le β -carotène est une molécule qui contient plusieurs doubles liaisons conjuguées (Figure III.6a), elle est présente dans les constituants des plantes et miscible à la cire de paraffine. Pour cette raison, la cinétique de photodégradation du CT sur cire pure a été comparée à celle sur cire contenant le β -carotène (Figure III.6b).

Figure III.6a : Structure chimique du β -carotène

Les résultats indiquent que la cinétique est beaucoup plus rapide en présence de β -carotène que sur la cire pure. Le même phénomène est observé lorsque l'on ajoute de l'isoprène à une solution de CT préparée dans l'heptane (Figure III.4). Ce phénomène pourrait avoir plusieurs explications. Nous avons vu que $^3\text{CT}^*$ se fait photoréduire par les molécules comportant des atomes H labiles. Le β -carotène contient de nombreux groupes méthyles fixés sur des doubles liaisons conjuguées. Les atomes H sont donc très labiles car après leur abstraction il y a formation de radicaux très stabilisés par résonnance. La constante de vitesse de réaction entre $^3\text{CT}^*$ et le β -carotène n'a pas été mesurée mais elle serait vraisemblablement assez élevée. Par ailleurs les radicaux produits dans la réaction peuvent s'additionner sur les doubles liaisons du β -carotène et conduire à des radicaux libres éventuellement capables d'attaquer une molécule de CT.

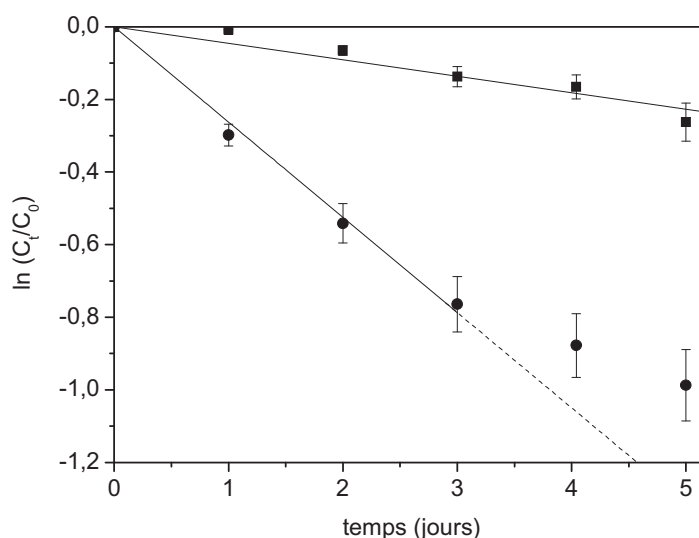


Figure III.6b : Photodégradation du CT à 500 g/ha sur film de cire de paraffine pure (■, $k=0,06 \text{ jours}^{-1}$) et contenant 5% en masse de β carotène (●, $k = 0,22 \text{ jours}^{-1}$) au Suntest à 500Wm^{-2} .

3.3 Synthèse de l'article et des expériences complémentaires

La phototransformation de CT a été étudiée en solvant organique et sur cire de paraffine. Le solvant choisi est l'heptane car il ressemble aux alcanes constitutifs des cires. Le rendement quantique de photodégradation dépend du milieu : il passe de $9,7 \times 10^{-4}$ dans l'acétonitrile aéré à 2×10^{-2} dans l'heptane aéré et 9×10^{-2} dans l'heptane désoxygéné. Il augmente en présence de donneur d'atome H. Les principaux photoproduits résultent d'une déchloration. En utilisant le DPBF comme capteur d'oxygène singulet, nous avons montré que CT produit de l'oxygène singulet avec un rendement quantique proche de 1. En revanche, CT ne réagit pas avec l'oxygène singulet.

Par photolyse flash nanoseconde en solution, nous avons détecté le triplet ($\lambda_{\text{max}} = 320 \text{ nm}$). Cette espèce a été caractérisée par sa réactivité avec l'oxygène ($7,8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) et par sa capacité à transférer son énergie sur l'anthracène (rendement quantique de 0,7). Ce résultat est en excellent accord avec la détection d'oxygène singulet. Par ailleurs, le triplet de CT réagit également avec les donneurs d'atome H. Ceci explique la formation des photoproduits de déchloration.

Sur film de cire, le chlorothalonil se photolyse lentement, de 10 % en 24 h. La réaction est nettement plus rapide pour la molécule formulée que pour la molécule pure. Ceci est attribué à la présence de donneurs d'atome H dans la formulation et à un effet d'étalement de la substance active par certains additifs de formulation.

4. Tentatives de dosages du CT dans et sur des cuticules de plantes par IR

Le but de l'expérience ci-dessous a été de détecter CT à la surface des cuticules de fruits par spectrophotométrie infrarouge. Dans un premier temps, les cuticules de laurier rose, pomme golden, pomme granny smith (g. s.), poivron vert et tomate ont été séparées enzymatiquement et analysées par ATR. Parmi les cuticules de fruits mentionnées ci-dessus, le CT a un usage agricole uniquement sur la tomate, les autres cuticules ont été choisies pour leur facilité de séparation. Les spectres ATR des cuticules sont présentés Figure III.7. Le spectre infra rouge de la cire de paraffine obtenue via la même méthode est aussi présenté.

Tous les spectres présentés à la Figure III.7 comprennent deux bandes entre 3000 et 2800 cm^{-1} caractéristiques de la vibration de la liaison carbone sp^3 – hydrogène. Ce résultat est cohérent du fait que la cire épicuticulaire et la cutine sont composés de longues chaînes carbonées. Les bandes autour de 1400 cm^{-1} sont attribuées à l'élongation de la liaison carbone sp^3 – hydrogène. La bande large présente entre 3100 et 3500 cm^{-1} pour les spectres du laurier rose, la pomme golden, le poivron vert et la tomate correspond à la vibration d'une liaison O-H. Il est cohérent que cette bande soit absente du spectre de la cire de paraffine parce que celle-ci ne contient pas de fonction alcool. En dessous de 1000 cm^{-1} , de nombreuses bandes apparaissent tandis que le spectre de la pomme g. s. reste le spectre de cuticule le plus simple. Pour cette raison, la cuticule de pomme g. s. a été choisie pour suivre les dépôts de CT.

La Figure III.8 illustre le spectre infrarouge du CT pur, lorsqu'il est appliqué à 1000 g/ha sur la cuticule de pomme g. s. et lorsqu'il est appliqué en présence d'agent d'étalement (Synperonic 10/6). Le spectre de CT pur présente une bande à 2240 cm^{-1} qui est attribuée à la triple liaison des nitriles ainsi que 5 bandes caractéristiques situés en dessous de 1550 cm^{-1} (Figure III.8). Toutes les bandes caractéristiques de CT à l'exception de celles à 2240 cm^{-1} et à 1550 cm^{-1} sont confondues avec celles de la cuticule de pomme g. s. ce qui rend difficile la détection. Lorsque CT est appliqué sur la cuticule, la bande à 2240 cm^{-1} n'est pas détectable pour une concentration surfacique de 1000 g/ha, d'ailleurs cette bande présente une faible intensité pour le spectre ATR du CT pur. En revanche une bande à 1683 cm^{-1} apparaît pour les cuticules imprégnées de CT ou de CT mélangé à un agent d'étalement et est absente du spectre la cuticule seule. Il se pourrait que cette bande corresponde à la bande 1550 cm^{-1} décalée. Cette question mériterait d'être étudiée plus en détail. Cette technique ne permet pas d'établir un suivi quantitatif du CT parce que l'intensité du signal est variable selon la zone de cuticule analysée. La technique a donc été abandonnée.

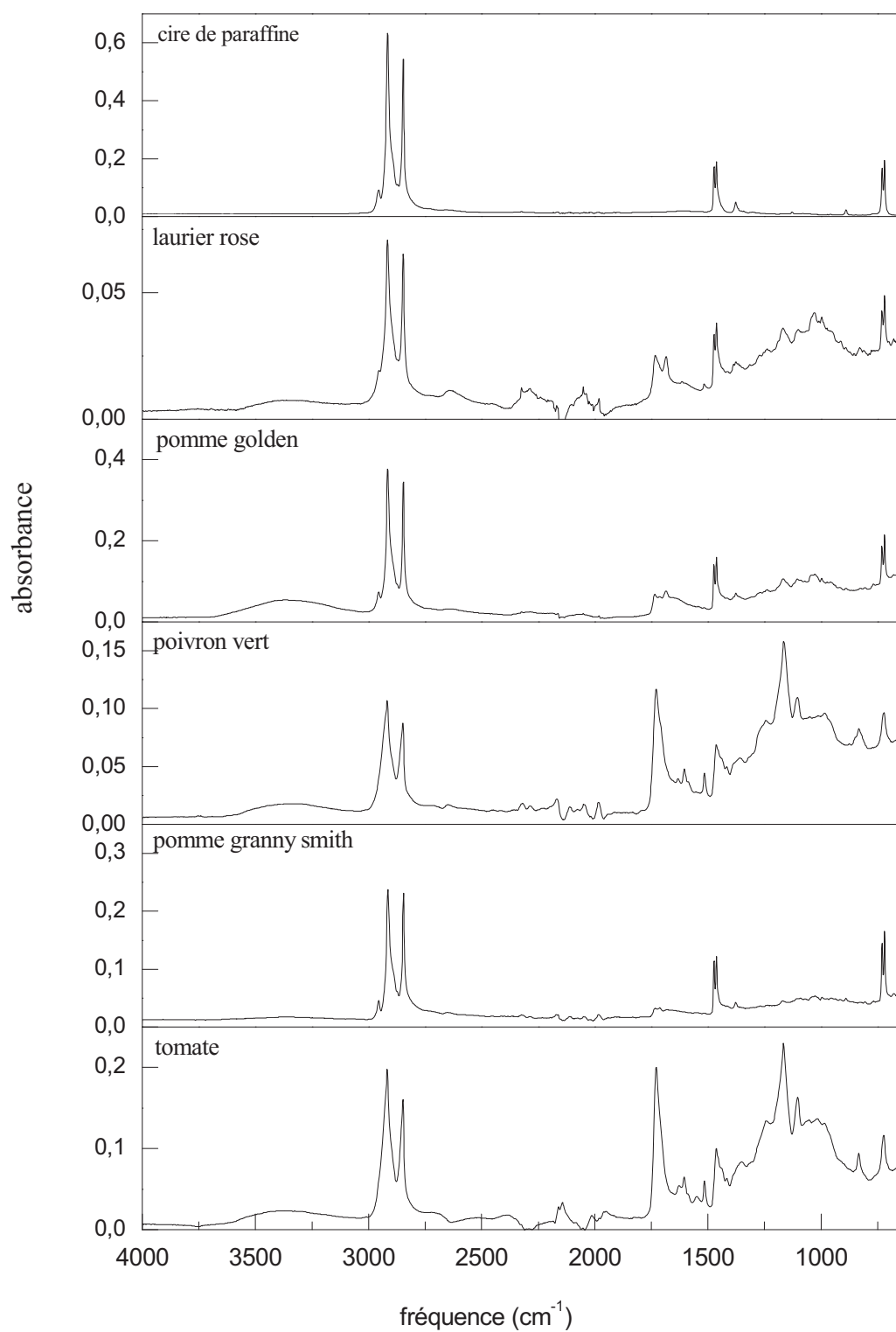


Figure III.7 : Spectre infrarouge des cuticules de fruits et feuilles.

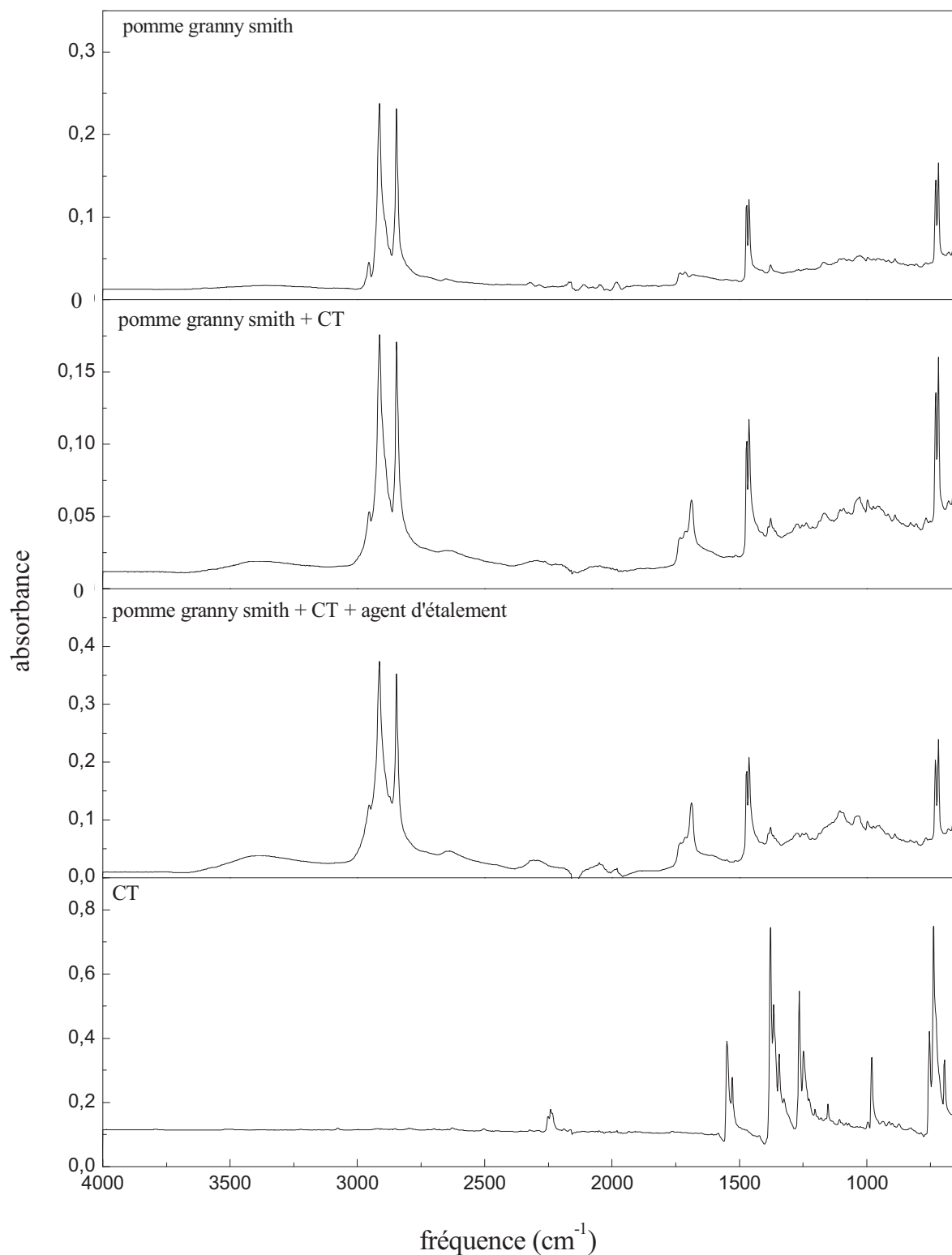


Figure III.8: Spectre infrarouge des cuticules de pomme granny smith recouvertes de CT.

5. Dosage dans la cire par spectroscopie UV-Visible

Le but de cette expérience a été de déterminer s'il était possible de suivre directement par spectrophotométrie UV-Visible la baisse de concentration en CT au cours de l'irradiation dans la cire. L'octadécane ($C_{18}H_{38}$) et le docosane ($C_{22}H_{46}$) sont des cires qui ont une température de fusion plus faible que les cires de paraffine ($mp = 27,8$ et 44 °C respectivement). Ils sont tous les deux à la fois solubles dans l'heptane et le chloroforme ce qui permet de résolubiliser le mélange cire-CT pour l'analyse HPLC.

Le mélange CT-cire a été préparé en ajoutant une quantité d'octadécane à une solution de CT à $1,5 \times 10^{-4}$ M dans l'heptane. La solution a ensuite été déposée sur des lames en quartz recouvertes de caches en téflon pour éviter que la solution ne s'étale. La concentration en $C_{18}H_{38}$ est de 2,5 g/L. Connaissant la surface de la lame de quartz et la densité de la cire, le volume de solution à déposer a été ajusté de manière à former des films de 10 et 100 μm . Après évaporation du solvant, le spectre d'absorption du film est enregistré par spectrophotométrie UV-Visible. Le spectre d'absorption du film obtenu est illustré à la Figure III.9.

Bien que la concentration surfacique du CT soit de 1000 g/ha, les maxima caractéristiques de la molécule à 312 et 325 nm sont juste détectables, seule la bande à 232 nm indique la présence de CT. **Ceci est dû au faible trajet optique des films, il n'est cependant pas envisageable d'augmenter l'épaisseur du film au risque de ne plus transmettre la lumière incidente.**

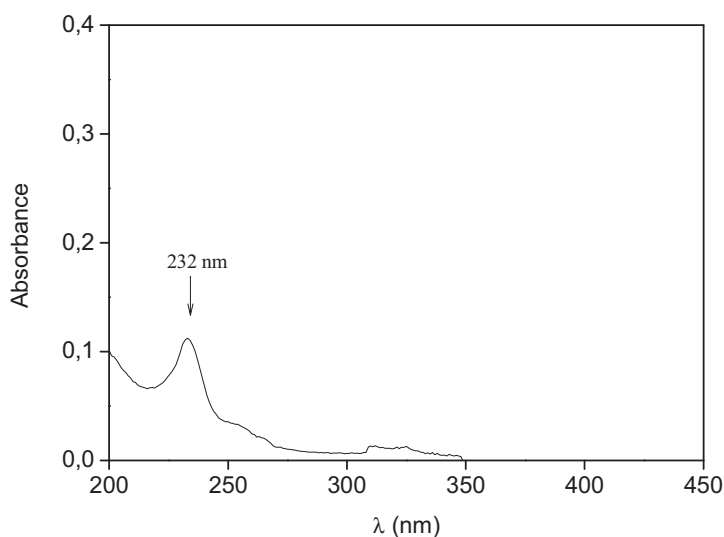


Figure III.9: Spectre d'absorption d'un film d'octadécane de 100 μm imprégné de CT à 1000g/ha sur une lame de quartz.

Par ailleurs, le dépôt n'est pas suffisamment homogène pour permettre d'effectuer un suivi quantitatif du CT par spectrophotométrie.

Une alternative est de doser CT dans la cire par HPLC en resolubilisant le film dans l'heptane. Les taux de récupération de la molécule obtenus avec cette méthode (échantillons non irradiés) sont fort variables. Il est plausible qu'une partie de la solution soit perdue par les côtés du cache en téflon déposé sur la lame de quartz. Pour remédier à ce problème, nous avons tenté de déposer la solution dans des cellules de quartz couchées longitudinalement et maintenues ouvertes pour évaporer le solvant. Malheureusement cette technique s'est avérée infructueuse, l'évaporation du solvant entraînant une montée de la cire sur la face supérieure de la cellule.

6. Conclusion

Bien qu'il existe de nombreuses publications traitant du chlorothalonil, aucune d'elles ne décrit de façon détaillée la photochimie de cette molécule ou sa cinétique de phototransformation sur les plantes. Pourtant, le chlorothalonil absorbe le rayonnement solaire jusqu'à 350 nm et est donc susceptible de se phototransformer.

Les études en solution nous ont permis de caractériser le principal intermédiaire réactionnel, l'état excité triplet, et de comprendre le mécanisme de photolyse. Sa réactivité avec l'oxygène et différents additifs a également été étudiée. L'état excité triplet du chlorothalonil présente une réactivité tout à fait remarquable : d'une part il sensibilise la formation d'oxygène singulet avec un rendement quantique proche de 1, d'autre part il est très oxydant et se fait même réduire par des alcanes. La molécule se photolyse jusqu'à 20 fois plus vite dans l'heptane que dans l'acétonitrile ce qui démontre une forte réactivité du triplet avec un solvant donneur d'hydrogène. La constante de vitesse de réaction du $^3\text{CT}^*$ avec le phénol est de $(1,83 \pm 0,14) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Les études sur cire montrent que le chlorothalonil se phototransforme également en phase solide. Sa durée de demi-vie de photodégradation extrapolée aux conditions extérieures est de 5 jours. Les résultats obtenus en solution permettent de comprendre le comportement photochimique sur cire et notamment l'effet photoaccélérateur des additifs de formulation. Ces données suggèrent que le chlorothalonil pourrait aussi être sensible à des métabolites secondaires contenus dans la cire et sans doute aussi aux constituants de la cire elle-même.

Considérant que le chlorothalonil produit de l'oxygène singulet, sa persistance sur les feuilles doit être prise en compte surtout lorsque la molécule est utilisée en mélange avec d'autres pesticides qui pourraient se faire oxyder. Cet aspect important sera examiné dans la suite de ce travail.

Références

1. Gisi, U.; Sierotsky, H. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *Eur. J. Plant Pathol.* **2008**, *122*, 157-167.
2. Keinatha, A. P.; Holmes, G. J.; Everts, K.L.; Egel, D. S.; Langston, D. B. Evaluation of combinations of chlorothalonil with azoxystrobin, harpin, and disease forecasting for control of downy mildew and gummy stem blight on melon. *Crop Prot.* **2007**, *26*, 83-88.
3. Jahn, C.; Zorn, H.; Petersen, A.; Schwack, W. Structure-specific detection of plant cuticle bound residues of chlorothalonil by ELISA. *Pest. Sci.* **1999**, *55*, 1167-1176.
4. Jahn, C.; Schwack, W. Determination of cutin-bound residues of chlorothalonil by immunoassay. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1233-1238.
5. Susuki, S.; Oda, M. Simultaneous determination of chlorothalonil, captan, and diazinon in apples. *Noyaku Kensasho Hokoku.* **1977**, *17*, 43-45.
6. Niu, D. S.; Hua, R. M.; Tang, J.; Wu, X. W.; Cao, H. Q.; Xu, Y. Photodegradation of chlorothalonil and chlorpyrifos on pepper surface. *J. Anhui Agri. Univ.* **2011**, *38*, 91-94.
7. Ma K. C.; Mackay, D.; Lee S. C.; Shiu, W. Y. Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals; CRC Press, **2006**.
8. Directorate D. Food safety: production and distribution chain European Commission Health & consumer protection directorate-general. Chlorothalonil SANCO/4343/2000; 06.
9. Chaves, A.; Shea, D.; Cope, W. G. Environmental fate of chlorothalonil in a Costa Rican banana plantation. *Chemosphere* **2007**, *69*, 1166-1174.
10. Szalkowski, M. B.; Stallard, D. E. Effect of pH on the hydrolysis of chlorothalonil. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *25*, 208-210.
11. Kwon, J. W.; Armbrust, K. L. Degradation of chlorothalonil in irradiated water/sediment systems. *J. Agric. Food Chemistry* **2006**, *54*, 3651-3657.
12. Penuela G.A.; Barcelo, D. Photodegradation and stability of chlorothalonil in water studied by solid phase disk extraction, followed by gas chromatographic techniques. *J. Chromatogr. A* **1998**, *823*, 81-90.
13. Sakkas, V. A.; Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A. Study of chlorothalonil photodegradation in natural waters and in the presence of humic substances. *Chemosphere* **2002**, *48*, 939-945.
14. Vialaton, D.; Richard, C. Phototransformation of aromatic pollutants in solar light: photolysis versus photosensitized reactions under natural water conditions. *Aquatic Science-Research across boundaries* **2002**, *64*, 207-215.
15. Calvet, R.; Barrusio, E.; Bedos, C.; Benoit, P.; Charnay, M. P.; Coquet, Y. Les pesticides dans le sol : conséquences agronomiques et environnementales. *France agricole* **2005**.

16. Bedos, C.; Rousseau-Djarbi, M. F.; Loubet, B.; Durand, B.; Flura, D.; Briand, O.; Barrusio, E. Fungicide volatilization measurements: inverse modeling, role of vapor pressure, and state of foliar residue. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 2522-2528.
17. Gilbert, M. Fate of chlorothalonil in apple foliage and fruit. *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24*, 1004-1007.
18. Millet, M.; Palm, W.-U.; Zetzsch, C. Abiotic degradation of halobenzonitriles: Investigation of the photolysis in solution. *Ecotoxicology and environmental safety* **1998**, *41*, 44-50.
19. Singh, B. K.; Walker, A.; Wright, D. J. Persistence of chlorpyrifos, fenamiphos, chlorothalonil, and pendimethalin in soil and their effects on soil microbial characteristics. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2002**, *69*, 181-188.
20. Reginato, J. B.; Tornisiello, V. L.; KLavorenti; Pacovsky, R. S. Transformation Pathways of ¹⁴C-Chlorothalonil in Tropical Soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2001**, *40*, 295-302.
21. Cox, C. Chlorothalonil, fungicide factsheet. *J. Pest. Reform*, **1997**, *17*, 14-20.
22. Hladik, M.; Kuivila, K. M. Analysis of chlorothalonil and three degradates in sediment and soil. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2310-2314.
23. Putnam, R. A.; Nelson, J. O.; Clark, J. M. The persistence and degradation of chlorothalonil and chlorpyrifos in a cranberry bog. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 170-176.
24. Nag, S. K.; Dureja, P. Environmental transformation of triadimefon in water and on plant leaf surface. *J. Environ. Sci. Health B* **2003**, *38*, 49-58.
25. Wang, D.; Chen, J.; Xu, Z.; Qiao, X.; Huang, L. Disappearance of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed on surfaces of pine (*Pinus thunbergii*) needles under irradiation of sunlight: volatilization and photolysis. *Atmos. Environ.* **2005**, *39*, 4583-4591.
26. Ter Halle, A.; Drncova, D.; Richard, C. Phototransformation of the herbicide sulcotrione on maize cuticular wax. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 2989-2995.

CHAPITRE IV

REACTIVITE DES PESTICIDES AVEC L'OXYGENE SINGULET

1. Introduction

L'un des objectifs de cette thèse était de déterminer si les pesticides, une fois déposés sur les feuilles, pouvaient potentiellement subir des phototransformations sensibilisées. L'existence de telles réactions repose sur la combinaison de deux facteurs : la présence de sensibilisateurs dans la cuticule et l'application de pesticides susceptibles de réagir par cette voie.

Dans ce chapitre, nous avons recherché des pesticides réagissant avec l'oxygène singulet. Il nous a fallu choisir quelques composés car il n'était pas envisageable d'en tester beaucoup. Notre choix s'est fait en fonction de plusieurs critères :

- les données bibliographiques rapportant cette propriété,
- la structure chimique, en particulier la présence de doubles liaisons. En effet, l'oxygène singulet peut donner lieu à trois types de réactions avec les oléfines et former des endoperoxydes, des hydroperoxydes allyliques ou des dioxétanes¹ (Figure IV.1).

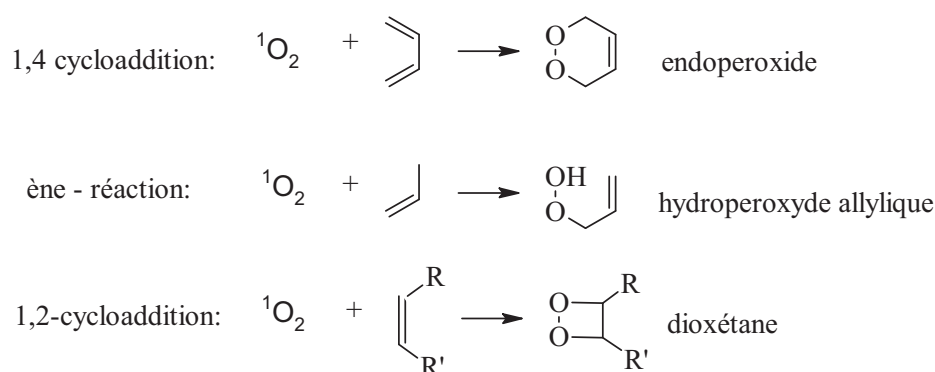


Figure IV.1 : Réactions entre ${}^1\text{O}_2$ et les oléfines¹.

Les composés soufrés ou azotés sont également connus pour réagir avec l'oxygène singulet^{1,2}.

La liste des molécules choisies est la suivante ; leurs spectres d'absorption sont donnés Figure IV.2

- α -cyperméthrine
- Cycloxydime
- Epoxiconazole
- Mandipropamide
- Folpet
- Picoxystrobine
- Mésotrione
- Pyriméthanil
- Propiconazole
- Thiophanate-méthyle

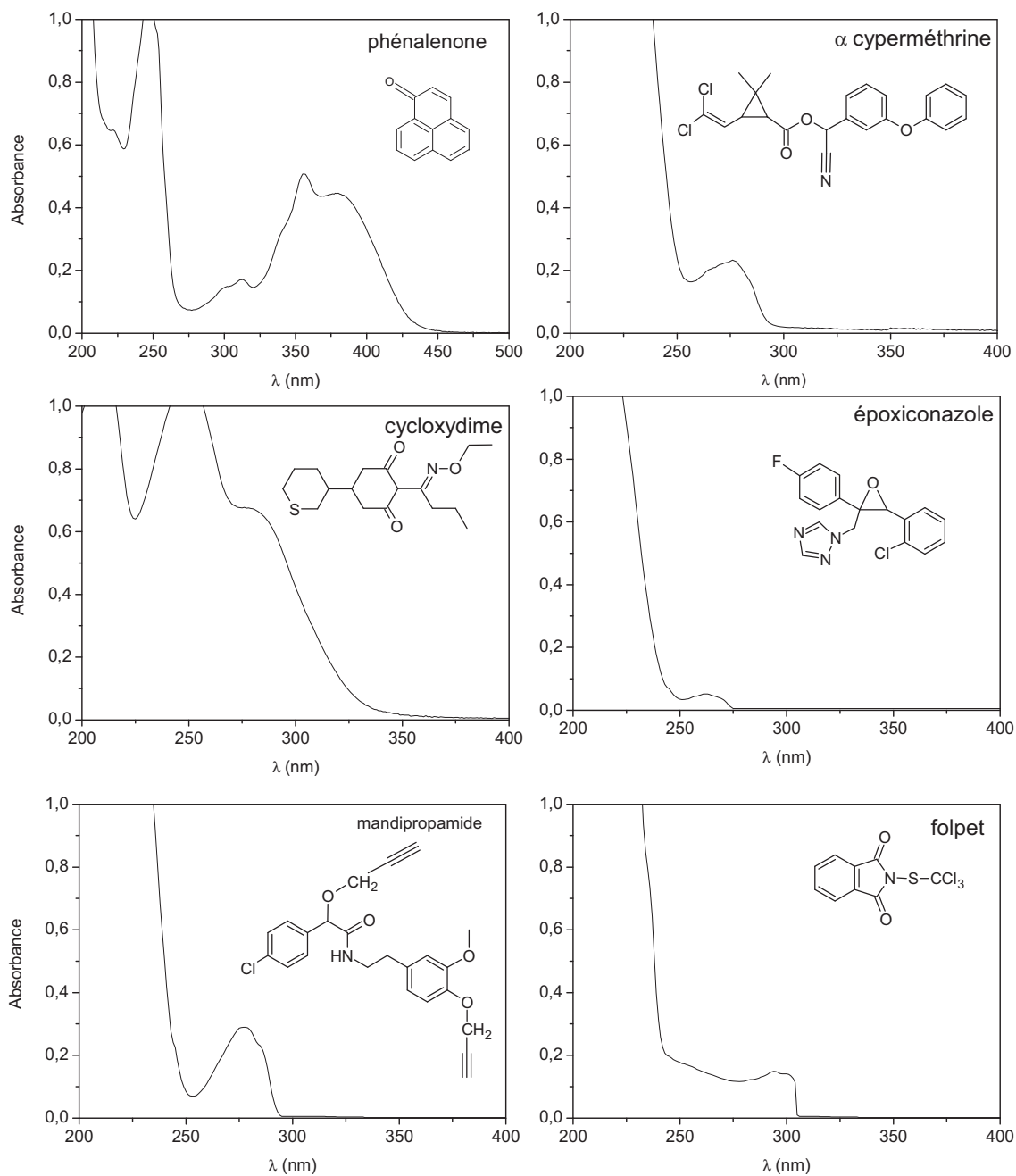


Figure IV.2a : Spectre d'absorption de la phénalénone (P) et des pesticides à 10^{-4} M dans l'acétonitrile.

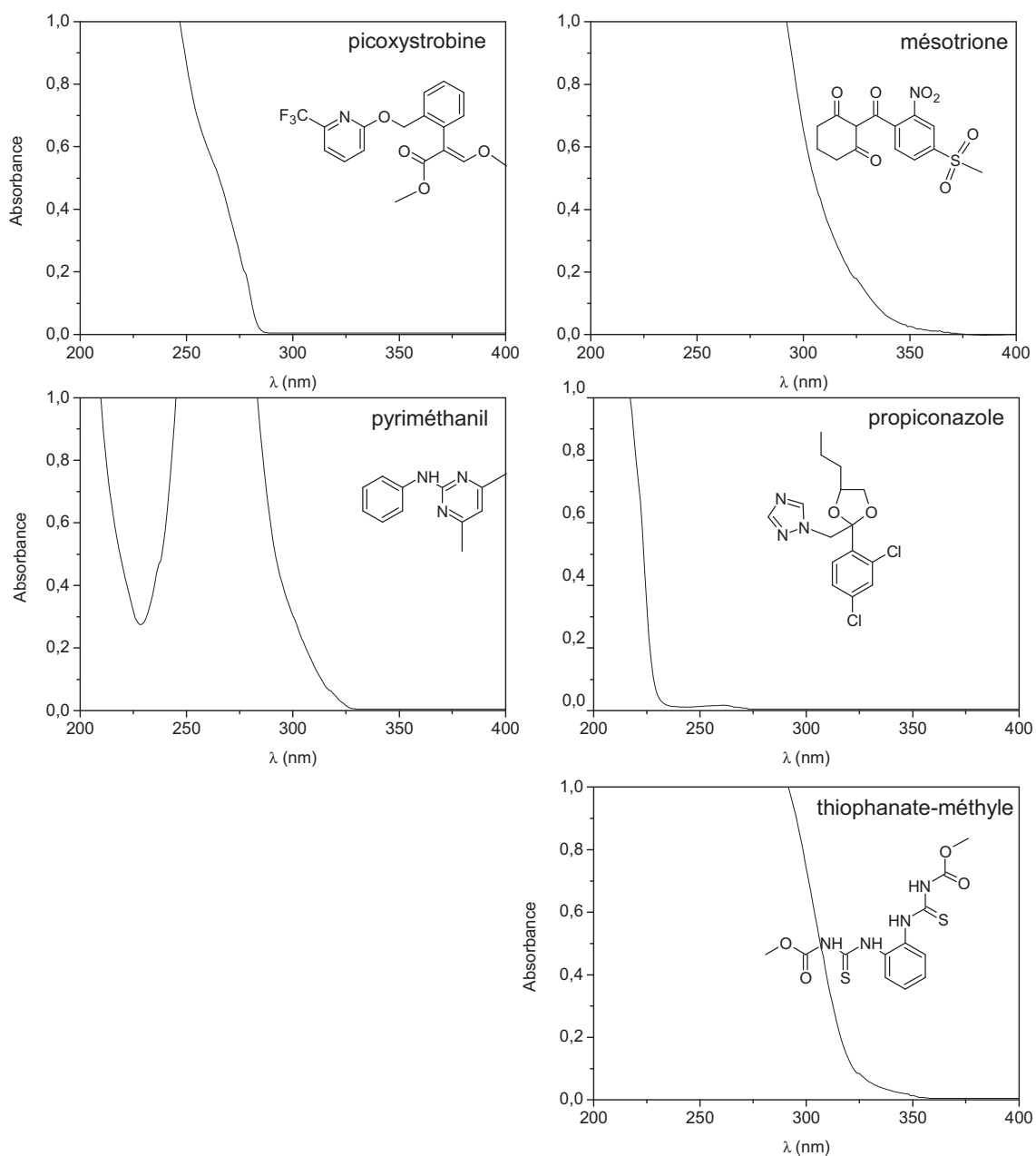


Figure IV.2b : Spectre d'absorption des pesticides à 10^{-4} M dans l'acétonitrile.

2. Réactivité avec l'oxygène singulet des pesticides choisis

La phénalénone (P) est un excellent sensibilisateur d'oxygène singulet. Son rendement quantique de production d'oxygène singulet (Φ_{Δ}) est proche de l'unité dans de nombreux solvants, c'est pourquoi il est aussi une référence universelle pour la mesure de la réactivité des composés vis à vis de $^1\text{O}_2$. Il est soluble dans la plupart des solvants et est un faible quencher de $^1\text{O}_2$ ⁽³⁾.

Les solutions de pesticides ont été préparées dans l'acétonitrile. La concentration en pesticide a été fixée à 10^{-4} M et celle de P à 5×10^{-5} M. Ces molécules absorbent essentiellement en dessous de 350 nm ce qui permet d'exciter sélectivement le sensibilisateur à 365 nm. On évite ainsi la photolyse directe des pesticides.

Les solutions contenant le mélange pesticide-sensibilisateur, saturées en air, ont été irradiées pendant 1 h à 365 nm avec un monochromateur à lampe à mercure. Chaque solution a ensuite été analysée par spectrophotométrie UV-Visible et le taux de conversion du pesticide a été mesuré avec précision par HPLC-DAD. Les résultats ont été les suivants :

- Aucune conversion n'a été relevée pour l' α -cyperméthrine, l'époxiconazole, le folpet, le mandipropamide, la picoxystrobine, le propiconazole et le pyriméthanil.
- En revanche, une dégradation a été mesurée pour la cycloxydime, le thiophanate-méthyle et la mésotrione avec des taux de conversion respectifs de 80, 26 et 6 %. On peut aussi remarquer que l'absorbance de ces trois composés à 365 nm est très faible mais non nulle ; il a donc été nécessaire de mesurer leur photolyse directe à 10^{-4} M à 365 nm pour nous assurer de l'effective phototransformation sensibilisée. Après une heure d'irradiation, le taux de conversion mesuré pour chacun des pesticides a été nul ou de l'ordre de l'incertitude de la mesure HPLC.

Ces expériences montrent que la cycloxydime, le thiophanate-méthyle et la mésotrione subissent une phototransformation sensibilisée. Pour déterminer s'il s'agit bien d'une réaction avec l'oxygène singulet, il est nécessaire de mener des expériences complémentaires. Notre choix pour la poursuite du travail s'est porté sur la cycloxydime car son taux de conversion est le plus grand.

Références

1. Clennan, E. L.; Pace, A. Advances in singlet oxygen chemistry. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 6665-6691.
2. Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1995**, *24*, 663-1021.
3. Schmidt, R.; Tanielian, C.; Dunsbach, R.; Wolff, C. Phenalenone, a universal reference compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen O₂ (¹Δ_g) sensitization. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1994**, *79*, 11-17.

CHAPITRE V

PHOTOTRANSFORMATION DE LA CYCLOXYDIME

1. Introduction

Ce chapitre est consacré à la phototransformation de la cycloxydime. Il vise à déterminer quelles sont ses voies de phototransformation directe et quelle est son aptitude à subir des phototransformations sensibilisées. Les études ont été entreprises en solution et sur support solide pour modéliser des situations différentes. Plusieurs cas de figures ont été examinés :

- cycloxydime seule, en solution dans l'acétonitrile,
- cycloxydime dans l'acétonitrile en présence de sensibilisateurs; les expériences avec la phénalénone sont décrites dans ce chapitre, celles en présence des phytoalexines khellin et visnagin sont décrites dans le chapitre VI,
- cycloxydime seule déposée sur film de cire pur et feuille de tabac,
- cycloxydime seule déposée sur film de cire contenant de la phénalénone,
- cycloxydime seule déposée sur film de cire contenant phytoalexines, expériences décrites dans le chapitre VI,
- cycloxydime en présence de chlorothalonil, tous deux déposés sur film de cire pur.

Ce chapitre est structuré de la façon suivante. Après une synthèse bibliographique consacrée aux herbicides de la famille des cyclohexanediones, nous présentons dans une première partie nos résultats sur la phototransformation de la cycloxydime en solution dans l'acétonitrile, d'abord seule puis en présence de phénalénone. Nous nous sommes intéressés aux réactions sensibilisées qui peuvent avoir lieu avec la cycloxydime dans les conditions environnementales et plus particulièrement à celles impliquant l'oxygène singulet. La phénalénone a été choisie comme sensibilisateur « modèle ». Cette partie est présentée sous la forme d'un article intitulé « Reactivity of cycloxydim toward singlet oxygen in solution and on wax film » publié dans le journal *Chemosphere*. Cet article est suivi d'expériences complémentaires. Les réactions sensibilisées de type I ont également été étudiées mais elles seront présentées dans le chapitre VI qui traite des sensibilisateurs eux-mêmes.

La seconde partie de ce chapitre est consacrée à la photodégradation de la cycloxydime sur support solide, à la fois sur modèle foliaire (les films de cire) et sur des feuilles de tabac détachées. La cycloxydime est seule ou en présence de producteur d'oxygène singulet. Nous avons examiné l'effet des paramètres suivants :

- la nature du solvant de dépôt,
- le volume de dépôt et de la taille des gouttes,
- la formulation,
- la nature du support,
- les résidus de chlorothalonil présents à la surface des films.

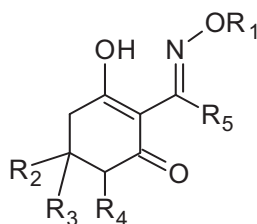
A noter que la partie dédiée à la caractérisation des photoproduits sera présentée dans le chapitre VII.

2. Etude bibliographique

2.1 Les cyclohexanediones oximes

Les herbicides appartenant à la famille des cyclohexanediones oximes sont des herbicides systémiques employés pour l'élimination des plantes graminées et des repousses de céréales. Ils manifestent une toxicité sélective vis-à-vis des plantes *monocotylédones*[†] en agissant sur l'acétyl-coenzyme A-carboxylase de celles-ci. Ils inhibent ainsi la synthèse d'acide gras ce qui engendre une cessation de la multiplication de la membrane cellulaire^{1,2}. Cette classe d'herbicide est appliquée sur les cultures à de faibles doses (< 300 g/ha) et se transforme facilement en milieu aquatique en présence de lumière solaire².

La structure générique des cyclohexanediones oximes ainsi que les groupements fonctionnels de huit herbicides appartenant à cette famille sont donnés Figure V.1. Comme leurs noms l'indique, la structure est composée d'un cyclohexane possédant deux fonctions cétones et une fonction oxime (C=N-O-R₁), plus précisément appelée éther d'oxime lorsque R₁ n'est pas un atome d'hydrogène.



pesticide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
alloxydime	C ₃ H ₅	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₃ O ₂	C ₃ H ₇
butroxydime	C ₂ H ₅	C ₁₃ H ₁₆ O	H	H	C ₂ H ₅
clethodime	C ₃ H ₄ Cl	C ₅ H ₁₁ S	H	H	C ₂ H ₅
cycloxydime	C ₂ H ₅	C ₅ H ₉ S	H	H	C ₃ H ₇
profoxydime	C ₉ H ₁₀ OCl	C ₅ H ₉ S	H	H	C ₃ H ₇
séthoxydime	C ₂ H ₅	C ₅ H ₁₁ S	H	H	C ₃ H ₇
tépraloxydime	C ₃ H ₄ Cl	C ₅ H ₉ O	H	H	C ₂ H ₅
tralkoxydime	C ₂ H ₅	C ₉ H ₁₁	H	H	C ₂ H ₅

Figure V.1 : Structure des cyclohexanediones oximes.

[†] monocotylédone : comprend les végétaux dont la graine constitutive évolue en donnant une préfeuille.

Les cyclohexanediones oximes sont des molécules qui présentent en solution un équilibre tautomérique où la forme énol est généralement prédominante² (Figure V.2.).

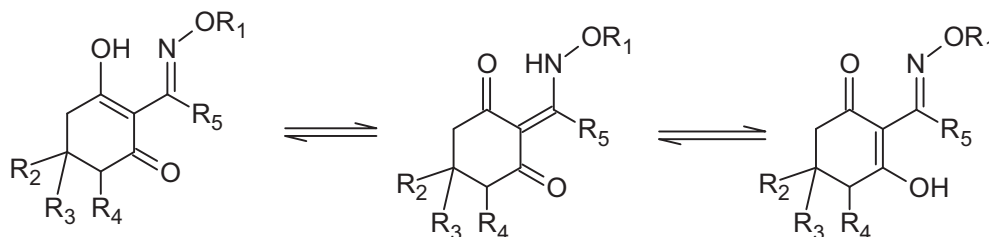


Figure V.2 : Équilibre céto-énolique des herbicides de la famille des cyclohexanediones oximes.

Par ailleurs, la présence de la fonction éther d'oxime entraîne l'existence de deux isomères *E* et *Z* (Figure V.3).

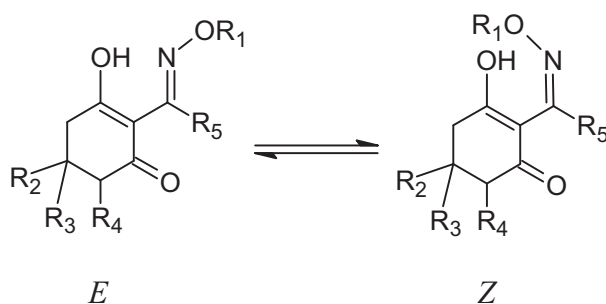


Figure V.3 : Isomères *E* et *Z* des cyclohexanediones oximes.

Les pesticides de cette famille sont commercialisés sous la forme *E*. Cet isomère est plus stable et plus actif que l'isomère *Z*³. Nous n'avons cependant trouvé aucune indication par notre fournisseur sur l'isomérisation de la cycloxydime utilisée au cours de ce travail. Nous pouvons souligner que quelle que soit la forme initiale de la molécule, l'isomérisation des oximes est dépendante du solvant. Contrairement aux liaisons carbone-carbone sp², les isomères des oximes sont en équilibre en milieu aqueux parce que la double liaison carbone azote est hydrolysable et l'oxime peut passer par un intermédiaire aminé. Parce que l'azote dans cet intermédiaire forme une liaison simple avec le carbone, la rotation devient alors possible et l'on peut passer de l'isomère *E* à l'isomère *Z* (et vice-versa). Ainsi pour certaines molécules de la série (cléthodime, tépraloxydime), l'isomère *Z* se forme spontanément dans l'eau. La lumière et la température influencent également cet équilibre. L'isomérisation des oximes est donc dépendante de trois facteurs : l'énergie d'activation photochimique, l'énergie d'activation thermique et le solvant^{4,5}.

2.2 Devenir dans l'environnement

2.2.1 Hydrolyse

Les cyclohexanediones oximes se dégradent généralement assez facilement en milieu aqueux. Dans certains cas, la dégradation est tellement rapide qu'il est légitime de se demander si l'activité herbicide n'est pas due aux produits de dégradation². C'est en milieu neutre qu'elles sont le plus stables. Ainsi la cléthodime se dégrade de 37 % en 20 heures à pH 5, de 8% à pH 6 et est stable à pH 7 mais aucun des produits de dégradation n'a été identifié⁶. Il est également rapporté dans la littérature que la séthoxydime est instable à pH acide et en milieu basique^{7,8}.

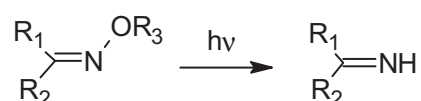
2.2.2 Photolyse

Les pesticides appartenant à la famille des cyclohexanediones oximes sont instables en présence de lumière. Il est d'ailleurs recommandé de les pulvériser sur les cultures en fin de soirée pour les préserver et augmenter leur efficacité⁹. Les cyclohexanediones oximes subissent une photolyse qui est très rapide sous lumière UV (< 300 nm) et significative mais plus lente en lumière solaire^{10,11}. Dans le cas de l'alloxydime et de la séthoxydime, la phototransformation est plus lente dans les eaux naturelles que dans l'eau ultrapure^{4,12}. Le même phénomène est observé pour la cléthodime, avec une durée de demi-vie de photolyse de 29 minutes dans l'eau ultra pure et de 44 minutes en milieu aqueux contenant des humiques, la source d'irradiation étant un simulateur de lumière solaire Suntest CPS¹⁰. Ce résultat montre que les constituants humiques dans l'eau auraient un rôle écran, absorbant compétitivement la lumière et diminuant ainsi l'absorption et donc la photodégradation du pesticide⁴. La séthoxydime est aussi une molécule qui semble être extrêmement photolabile⁷. Le choix des conditions d'irradiation est crucial car il gouverne l'importance relative des protons absorbés par chacune des molécules.

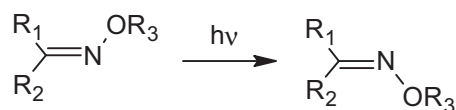
2.2.3 Nature des photoproduits

La formation de nombreux photoproduits est rapportée pour cette famille de pesticides mais peu sont caractérisés. On peut toutefois distinguer les trois voies majeures de photodégradation en comparant les principaux photoproduits de l'alloxydime, de la cléthodime et la séthoxydime^{4,10,12,13} :

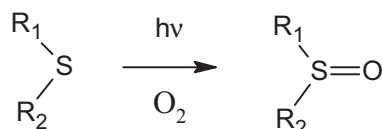
1. La photoréduction de la fonction oxime en imine:



2. La photoisomérisation :



3. L'oxydation du soufre en sulfoxyde (observé pour la cléthodime et la séthoxydime) :



2.3 Cas particulier de la cycloxydime

La cycloxydime (CD) est un herbicide systémique antigraminé employée en *post-émergence*[‡] sur les cultures de vignes, colza, tournesol, betterave et les cultures légumières pour éliminer les graminées adventices tels que la folle avoine, le chiendent ou les repousses de céréales. Il est aussi appliqué sur les cultures de maïs de variétés résistantes à l'herbicide¹⁴. La molécule est principalement absorbée par les feuilles pour être transportée par la sève vers les tissus méristématiques mais une partie peut également être absorbée par les racines. Sa pénétration foliaire est très rapide de sorte que le composé est à l'abri du lessivage et du rayonnement solaire rapidement après son application. L'activité en *pré-émergence*[§] de la molécule est faible du fait de sa décomposition rapide^{1,15}. Ses propriétés physico-chimiques sont rassemblées dans le tableau V.1.

Tableau V.1 : Propriétés physico-chimique de la cycloxydime.

solubilité dans l'eau mg/L à 20°C	38
solubilité dans le n-hexane à 20°C g/L	45
log K _{OW} à pH5	6,3 × 10 ⁻⁴
log K _{OW} à pH7	6,3 × 10 ⁻²
mp (°C)	38
masse molaire g/mole	325,46
pression vapeur à 25°C (mm Hg)	< 7,5 × 10 ⁻⁸
pKa	4,17

[‡] *Post-émergence* : pesticides appliqués sur la plante.

[§] *Pré-émergence* : pesticides ajoutés au sol avant la mise en place de la culture.

Le coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}) exprime l'affinité d'un composé pour la phase octanol ou aqueuse ce qui renseigne sur le caractère hydrophile/hydrophobe d'une molécule. En l'occurrence, CD a plus d'affinité pour la phase organique lorsque la phase aqueuse est basique (Tableau V.1). CD possède un faible potentiel de volatilisation¹ (sa pression de vapeur est inférieure à $7,5 \times 10^{-8}$ mm Hg) (Tableau V.1). Elle est peu soluble dans l'eau et à pH neutre elle se trouve sous forme anionique. En solution aqueuse, la molécule s'hydrolyse mais elle est plus stable en milieu basique qu'en milieu acide. Sa durée de demi-vie d'hydrolyse est de 2,1 ; 12,2 ; 264 et 958 jours à pH 4, 5, 7 et 9 respectivement. Sa vitesse de disparition est nettement accélérée en présence de lumière. La durée de demi-vie sous irradiation est de 5,8 ; 17,6 et 22,3 heures à pH 5, 7 et 9 respectivement¹⁶. D'après le dossier d'homologation¹⁷ dont sont extraites ces données, il se forme de très nombreux produits de dégradation dans l'environnement. Il n'existe jusqu'à présent aucune étude de la molécule sur sa photodégradation sur support solide ou sur les plantes. Nous avons choisi de présenter dans la Figure V.4 les principaux composés qui résultent de la photolyse de CD en milieu aqueux. La photolyse de CD à pH 5 conduit à la formation des composés I, III, IV et V. A pH 7 on forme les composés I, III et V. Enfin à pH 9, on observe la formation des composés I, II et III.

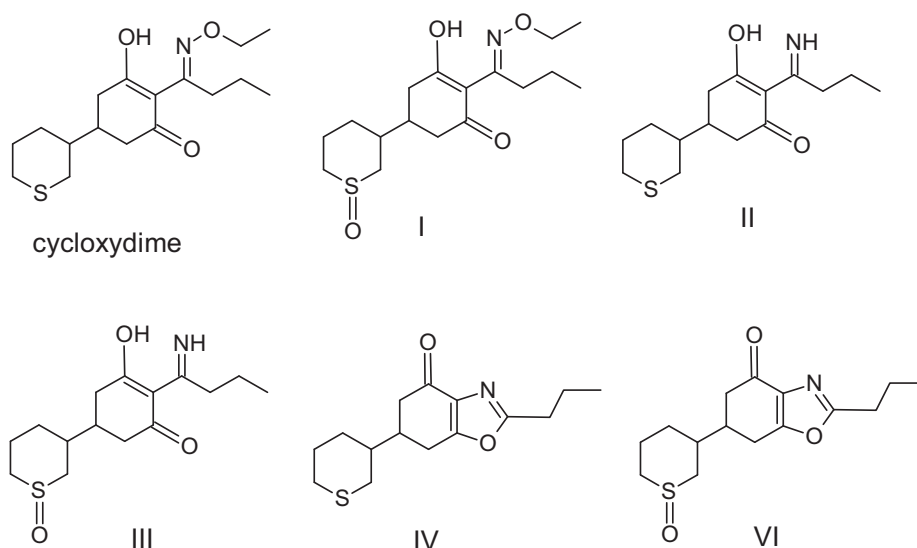


Figure V.4 : Principaux produits de photodégradation de la cycloxydime retrouvés dans l'environnement. Plusieurs isomères existent pour chaque composé.

Les photoproduits cités ci-dessus sont souvent également retrouvés dans les autres compartiments de l'environnement. On peut constater que l'oxydation du soufre se fait facilement.

3. Phototransformation de la cycloxydime en solution

3.1 Etude de la structure de la cycloxydime par résonance magnétique nucléaire

Les expériences en solution ont été principalement réalisées en utilisant l'acétonitrile comme solvant. D'une part, cela évite l'hydrolyse de la molécule, même si elle est faible en milieu neutre et d'autre part la solubilité est meilleure. Parce que l'isomérisation de CD dépend de la nature du solvant, nous avons souhaité identifier sa structure dans l'acétonitrile par résonance magnétique nucléaire (RMN). L'eau est également un solvant essentiel puisqu'il est utilisé pour diluer les formulations de pesticides. Nous n'avons toutefois pas pu déterminer la structure de la molécule dans l'eau deutérée car les analyses RMN nécessitent des solutions de concentrations élevées, or la solubilité du CD est seulement de 38 mg/L dans l'eau. Les spectres de ^{13}C et de ^1H ont donc été uniquement obtenus dans l'acétonitrile deutéré (Figure V.5 et V.6 respectivement). Seuls treize atomes de carbone et treize atomes d'hydrogène sont détectés du fait que certains sont équivalents ou qu'ils ont des environnements très proches. Les déplacements mesurés pour l'analyse du ^{13}C (101 MHz, CD_3CN) sont les suivants : 163,71 ; 107,13 ; 69,57 ; 41,32 ; 36,29 ; 30,32 ; 28,68 ; 28,31 ; 27,82 ; 27,26 ; 19,64 ; 13,24 et 13,20 ppm. Les déplacements mesurés pour l'analyse du ^1H (400 MHz, CD_3CN) sont les suivants : 14,17 (s, 1H) ; 4,24 (q, $J = 7,0$ Hz, 1H) ; 3,04 – 2,88 (m, 1H) ; 2,69 (dd, $J = 17,0$; 7,8 Hz, 1H), 2,59 (dd, $J = 22,5$; 12,9 Hz, 1H), 2,51 – 2,26 (m, 1H) ; 2,26 – 2,10 (m, 1H) ; 1,96 (d, $J = 13,2$ Hz, 1H) ; 1,89 – 1,68 (m, 1H) ; 1,64 (dq, $J = 14,9$; 7,6 Hz, 1H) ; 1,39 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H) ; 1,32 (d, $J = 13,3$ Hz, 1H) et 1,05 ppm (t, $J = 7,4$ Hz, 1H).

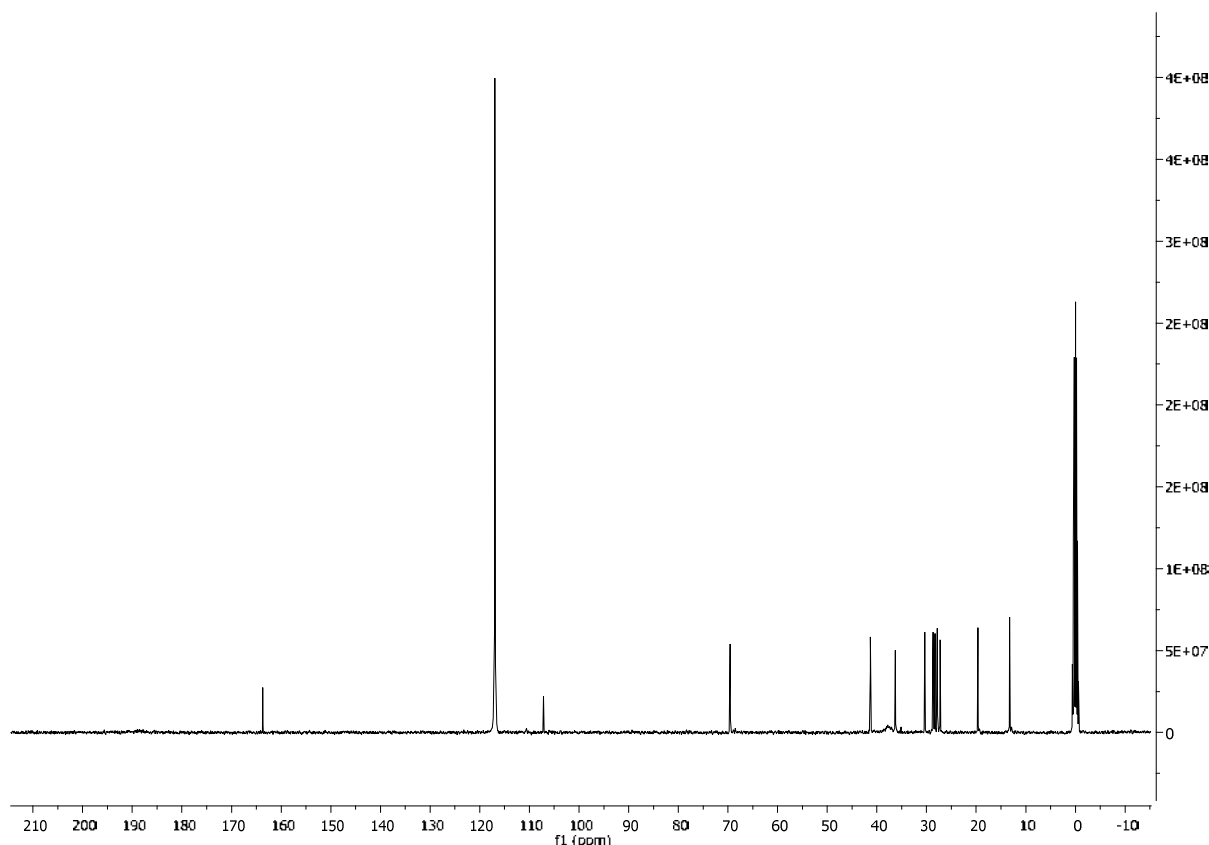
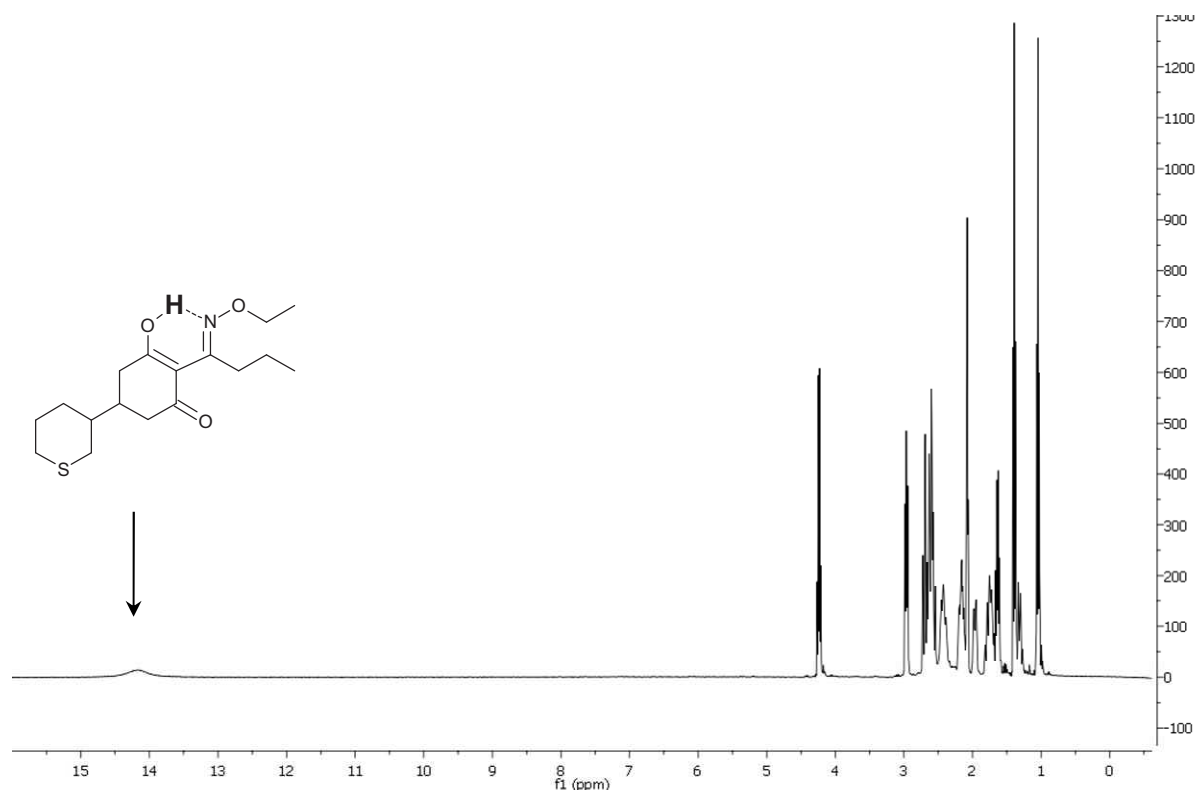


Figure V.5 : Spectre RMN du ^{13}C de CD (101 MHz, CD_3CN).

Figure V.6 : Spectre RMN du proton de CD (400 MHz, CD_3CN).

La Figure V.7 présente les trois structures tautomériques possibles pour l'isomère *E* de CD. Les déplacements obtenus par analyse ^{13}C sont proches de ceux attendus pour les structures B et C mais différents de ceux attendus pour la structure A. L'analyse complémentaire de RMN du proton montre la présence d'un proton échangeable singulet à 14,17 ppm (Figure V.6) ce qui exclut la structure A. Le déplacement du proton sur la fonction amine de B est attendu à 2 ppm et sur la fonction hydroxyle de C à 17 ppm. Cette donnée démontre que la structure de CD dans l'acétonitrile est C (la forme émol).

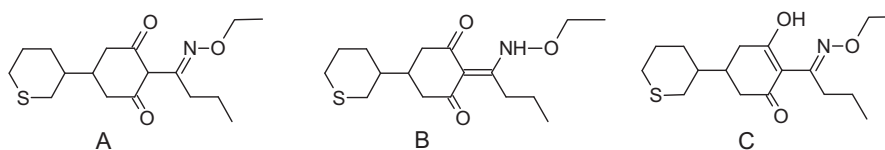


Figure V.7 : Principales structures tautomériques de CD

Ce résultat est en accord avec les observations des équilibres céto-énoliques décrits dans la littérature^{18,19} : il est connu que dans les équilibres céto-énoliques des 1,3 dicétones la forme émol est hautement contributive. L'équilibre peut-être légèrement déplacé vers la forme cétone dans les solvants très polaires ou lorsque des gênes stériques empêchent la formation de pont hydrogène intramoléculaire avec l'émol. En réalité, en présence de la forme émol et lorsque l'isomère est *E*, un pseudo-cycle peut s'établir grâce à la liaison intramoléculaire entre l'hydrogène du groupement hydroxyle et l'azote. Ceci a une influence directe sur la polarité

de la molécule : il est rapporté dans la littérature que la forme énol est moins polaire que la forme cétone¹⁹ ou que les isomères *E* des cyclohexanediones oximes sont moins polaires que les isomères *Z*^{3,6}. Ceci est probablement lié au fait que le proton de l'hydroxyle est moins disponible pour interagir avec le solvant. Nous avons tenté de déterminer les couplages des protons entre les chaînes propyle et éthoxyle de CD pour savoir si nous avions la forme *E* ou *Z* de la structure C mais les résultats n'ont pas été concluants. Toutefois, pour les raisons citées ci-dessus, l'isomère *E* est vraisemblablement favorisé dans l'acétonitrile.

Parallèlement à l'analyse RMN, nous avons tenté de détecter la fonction alcool de CD par spectroscopie IR mais aucune bande caractéristique de l'alcool n'a pu être mise en évidence.

La solution de CD préparée dans l'acétonitrile est composée essentiellement de l'isomère *E*, toutefois l'analyse HPLC-DAD qui permet la séparation des deux isomères qui ont des polarités très différentes montre que l'isomère *Z* est aussi présent. L'isomère *Z* étant plus polaire est élué en premier sur la colonne de phase inverse (Figure V.8).

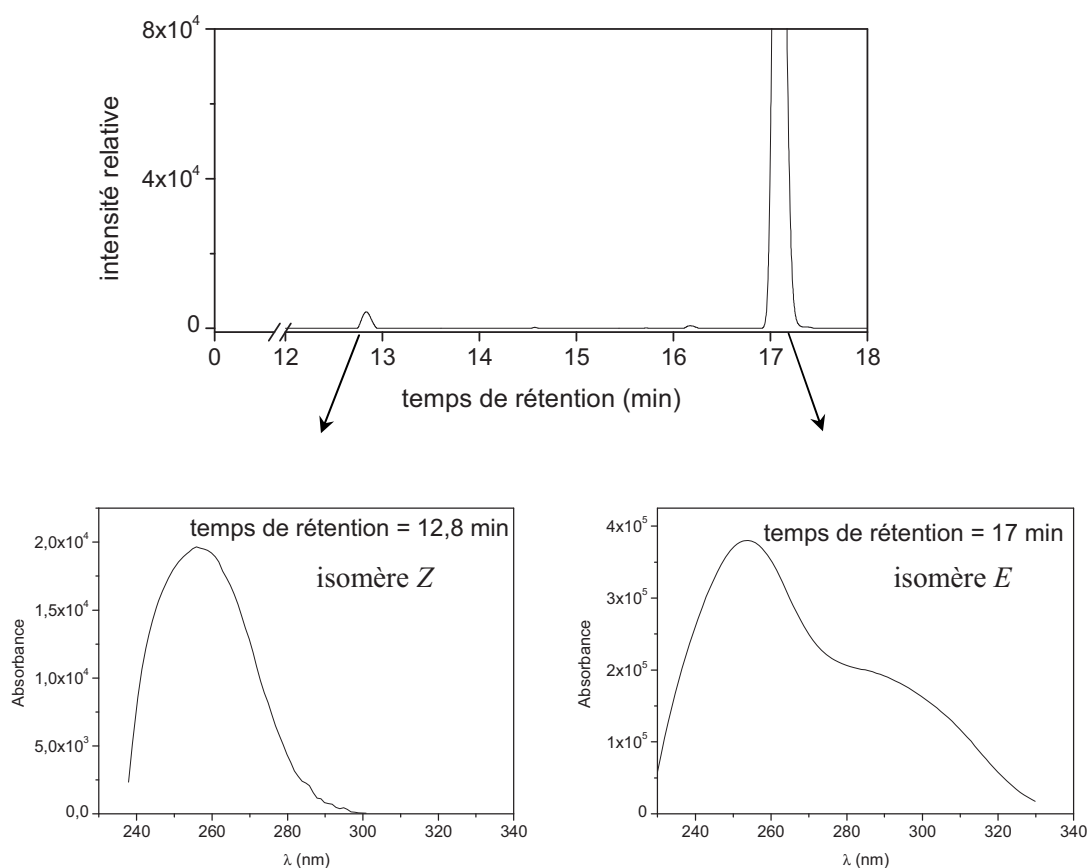


Figure V.8 : Chromatogramme HPLC à 280 nm de CD préparé dans l'acétonitrile et spectre d'absorption des deux isomères.

3.2 Propriétés spectrales de la cycloxydime

Les spectres d'absorption de CD dans l'acétonitrile et dans l'heptane sont donnés Figure V.9. Au dessus de 225 nm, deux bandes principales sont observées dans l'acétonitrile : à 250 nm ($\epsilon_{250} = 11100 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) et 279 nm ($\epsilon_{279} = 6730 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$). On remarque que l'absorption se prolonge au-delà de 350 nm. Le spectre de CD obtenu dans l'heptane est très semblable, un léger effet hypsochrome est observé. Nous pouvons conclure que la structure de CD dans ces deux solvants est la même.

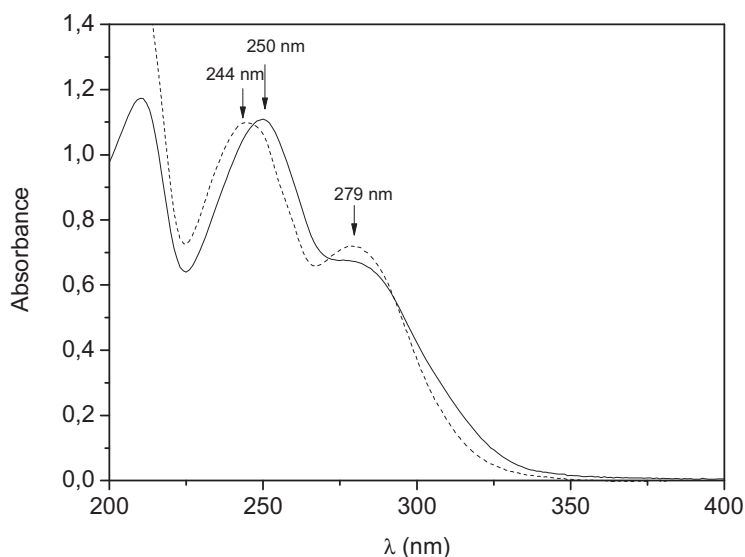


Figure V.9 : Spectre d'absorption de CD à 10^{-4} M dans l'acétonitrile (trait plein) et dans l'heptane (trait pointillé).

Les spectres d'absorption de CD dans l'eau tamponnée à pH 3 et pH 7 sont donnés Figure V.10. Au dessus de 225 nm, une seule bande d'absorption est détectée aux deux pH ; le maximum est situé à 259 nm à pH 3 et à 282 nm en milieu neutre. Le pK_a étant de 4,17, CD est sous forme moléculaire à pH 3 et sous forme anionique à pH 7. Les différences de spectres s'expliquent donc par le fait que la forme anionique absorbe plus à plus grande longueur d'onde que la forme moléculaire. Le coefficient d'extinction de CD à pH 3 à 259 nm est de $11130 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ et de $14900 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ à pH 7 à 282 nm. Ces deux spectres sont assez différents de ceux mesurés dans l'acétonitrile et l'heptane, il semblerait que la bande d'absorption présentant un maximum à 279 nm soit décalée vers les courtes longueurs d'onde en milieu aqueux et ne deviennent donc plus visible.

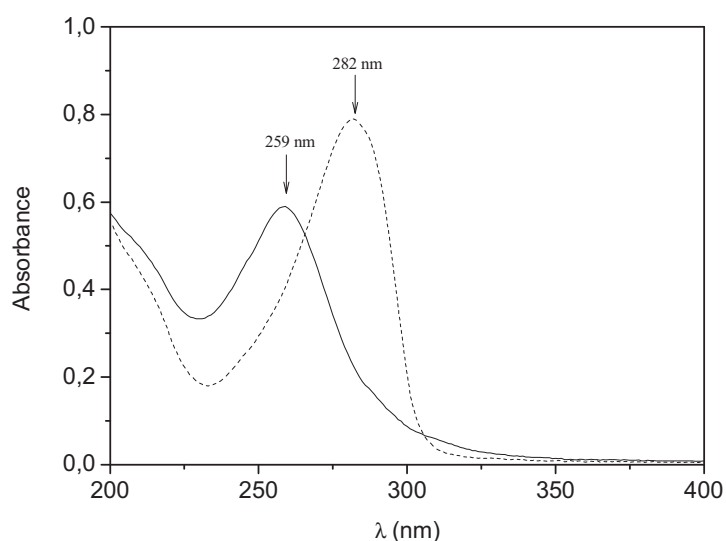


Figure V.10 : Spectre d'absorption de CD à $5,3 \times 10^{-5}$ M dans l'eau à pH 3 (trait plein) et à pH 7 (pointillé).

3.3 Phototransformation de la cycloxydime - mesure du rendement quantique de photodégradation

Afin d'évaluer la photodégradabilité de CD, son rendement quantique de photodégradation (Φ_{deg}) a été mesuré à 334 nm dans l'acétonitrile. Le Φ_{deg} est égal au nombre de molécules ayant réagi par seconde, divisé par le nombre de photons absorbés par seconde par la molécule à la longueur d'onde d'irradiation. Afin de déterminer avec précision le flux de photons de la lampe à 334 nm, une actinométrie chimique a été réalisée. Ensuite, une solution de CD préparée dans l'acétonitrile (10^{-4} M) a été irradiée avec une lampe à arc à mercure équipée d'un monochromateur. La solution a été irradiée pendant 1 h à 334 nm. Le taux de conversion de CD a été mesuré par HPLC-DAD. La valeur de Φ_{deg} mesuré à 334 nm dans l'acétonitrile saturé d'air est de $(3,9 \pm 0,2) \times 10^{-2}$. Les Φ_{deg} de CD dans l'eau rapportés dans la littérature sont de $5,68 \times 10^{-3}$ à pH 5, $1,87 \times 10^{-4}$ à pH 7 et $2,02 \times 10^{-4}$ à pH 9¹⁶. Nos valeurs sont nettement plus élevées, le solvant a donc beaucoup d'importance dans le processus.

3.4 Réactivité de la cycloxydime avec l'oxygène singulet

Lorsque les plantes sont soumises au stress UV ou à une attaque pathogène, elles peuvent produire des métabolites secondaires pour se défendre. Chez certaines plantes, il arrive que ces métabolites secondaires aient des propriétés sensibilisatrices ; ils sont alors appelés phototoxines. La présence des phototoxines dans les cellules épidermales des plantes favorise leur contact avec l'oxygène de l'air. Par conséquent, le transfert d'énergie entre les états excités des phototoxines et l'oxygène atmosphérique peut conduire à la formation d'oxygène singulet. Cette espèce a une durée de vie en phase gazeuse suffisamment longue pour pouvoir diffuser autour de sa zone de production. Il peut ainsi atteindre la surface de la plante et

oxyder les composés chimiques se trouvant à sa surface. Parce qu'après pulvérisation les pesticides se retrouvent à la surface des plantes, nous avons voulu vérifier si l'oxygène singulet produit par les phototoxines des plantes pouvait avoir une incidence sur leur dégradation.

Nous avons tout d'abord mesuré la réactivité de CD avec l'oxygène singulet en solution dans l'acétonitrile. Pour ce faire, nous avons utilisé un sensibilisateur « modèle », la phénalénone. Cette molécule présente un rendement quantique de production d'oxygène singulet beaucoup plus élevé que les phototoxines des plantes mais notre objectif principal était de mettre en évidence une éventuelle réactivité de CD avec l'oxygène singulet et de mesurer la constante de vitesse de réaction. Puis, nous avons mis en place une série d'expériences permettant d'étudier la réactivité de CD avec l'oxygène singulet en phase solide. La phénalénone a été incluse dans des films de cire et CD a été déposé à leurs surfaces.

3.4.1 Reactivity of cycloxydim toward singlet oxygen in solution and on wax film

Monadjemi S., Ter Halle, A., Richard, C. *Chemosphere* **2012**, 89, 269-273.



Reactivity of cycloxydim toward singlet oxygen in solution and on wax film

Shirin Monadjemi^a, Alexandra ter Halle^{a,b}, Claire Richard^{a,b,*}

^a Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France

^b CNRS, UMR 6296, ICCF, F-63171 AUBIERE, France

HIGHLIGHTS

- ▶ We show that cycloxydim is oxidized by $^1\text{O}_2$.
- ▶ The rate constant of reaction of cycloxydim with $^1\text{O}_2$ was measured.
- ▶ Triplet phenalenone is also quenched by CD.
- ▶ CD reacts with $^1\text{O}_2$ when sensitizer is inside wax films and CD on the films surface.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 January 2012
Received in revised form 11 March 2012
Accepted 17 April 2012
Available online 15 May 2012

Keywords:

Cycloxydim
Singlet oxygen
Plant
Photoreactivity
Kinetics
Wax

ABSTRACT

The reactivity of the herbicide cycloxydim (CD) toward singlet oxygen was studied in organic solution and on wax films to mimic the leaf surface. Experiments in solution were conducted in acetonitrile using phenalenone as a sensitizer. For the experiments in the solid state, phenalenone was included in paraffinic wax films and CD deposited at the film surface. By laser flash photolysis we observed that the triplet of phenalenone reacts with CD with a bimolecular rate constant of $(9.6 \pm 1) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. However, scavenging experiments using β -carotene as a singlet oxygen quencher showed that the observed CD degradation in aerated acetonitrile involves singlet oxygen essentially. The bimolecular rate constant of reaction of CD with singlet oxygen was evaluated to $(1.0 \pm 0.2) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Phenalenone included in the wax films also significantly increased the rate of CD photodegradation, the involvement of singlet oxygen being very likely. The photoproducts formed via the singlet oxygen pathway resulted from the oxidation of the thiol group and/or the cyclohexene ring. This study should help to better understand the fate of CD after its spraying on crops.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The fate of agrochemicals is intensively studied in water, soil and air environment but there is an obvious lack of data concerning the photoreactivity of pesticides on vegetation. Yet, the surface of leaf which is covered by a thin layer of waxy membrane is the first place where pesticides start to react just after their application (Koch and Ensikat, 2008; Katagi, 2011). Provided that pesticides absorb solar radiations, phototransformation can occur on these surfaces exposed to sunlight. Examples of reactions have been reported in the literature (Ter Halle et al., 2007; Eyheraguibel et al., 2009).

In addition to the photolytic processes induced by absorption of light by the pesticide itself, photosensitized reactions may also happen due to the presence in the cuticular wax of all sorts of

compounds synthesized by the plant and referred to as secondary metabolites. Some of these chemicals which are produced by plants in response to pathogen infections or mechanical injury show phototoxicity through photosensitizing properties (Downum and Nemec, 1987; Flors and Nonell, 2006). They can react directly with the pesticide (type I mechanism) or induce the formation of reactive oxygen species such as singlet oxygen (type II mechanism) (Flors and Nonell, 2006). Indeed, the presence of phototoxic compounds primarily in epidermal tissues favors contact with atmosphere, making feasible energy transfer from their photochemically excited states to atmospheric oxygen to form singlet oxygen. Because of its long lifetime in the gas phase, $^1\text{O}_2$ is expected to diffuse around its site of production (Midden and Wang, 1983; Downum and Nemec, 1987; Berenbaum and Larson, 1988) and should be able to reach the leaf surface where it can oxidize chemicals. For this reason, this is important to investigate the reactivity of protection plant products toward singlet oxygen.

Cycloxydim (CD) is a systemic herbicide belonging to the cyclohexanedione oxime group. This herbicide, which is used for the control of grass weeds of many agricultural and horticultural

* Corresponding author at: Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France. Tel.: +33 4 73 40 71 42.

E-mail address: claire.richard@univ-bpclermont.fr (C. Richard).

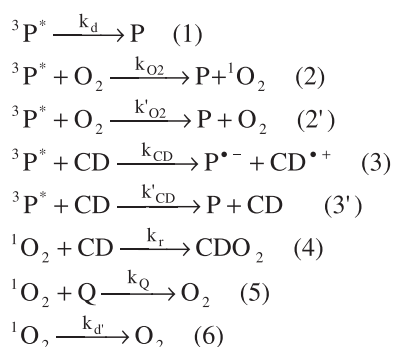


Fig. 1. Reactivity of ${}^3\text{P}^*$.

broad-leaved crops, has a low potential of volatilization ($<10^{-5}$ Pa at 20 °C) and is almost exclusively present in the particle adsorbed phase (Bidleman, 1988; EFSA, 2010). The objective of this study was to measure the reactivity of CD toward singlet oxygen to better understand its fate after spraying on the crops. This was achieved using phenalenone (P) as a sensitizer. P is reported to have a high quantum yield of intersystem crossing (Φ_{ISC}). For instance, Φ_{ISC} is equal to (1.0 ± 0.1) in benzene (Schmidt et al., 1994). Processes involving triplet phenalenone are given in Fig. 1. The main reaction pathway of triplet phenalenone (${}^3\text{P}^*$) in aerated solvents is formation of singlet oxygen through process 2. The quantum yield of singlet oxygen production (Φ_{Δ}) is high and equal to (0.98 ± 0.07) in acetonitrile (Schmidt et al., 1994), thus process 2' is negligible. P is photochemically stable and it is a poor quencher of ${}^1\text{O}_2$ (Schmidt et al., 1994). Besides, in mixture with CD, P has also the advantage to be selectively excited at 365 nm. Measurements in the liquid phase were conducted in acetonitrile to avoid CD hydrolysis. Experiments were also conducted with CD as a solid. In this case, P was included inside wax films and CD deposited at the film surface to mimic leaf surface.

2. Experimental section

2.1. Chemicals

All chemicals were used as received. Cycloxydim (98%) was obtained from Fluka (Saint-Quentin Fallavier, France). β -Carotene, type I (95%), paraffin wax (mp 70–80 °C), phenalenone (97%), furfuryl alcohol (99%) acetonitrile (HPLC grade) and n-heptane (spectrophotometric grade) were all purchased from Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Water was purified using a Millipore Milli-Q system (Millipore αQ , resistivity 18 M Ω cm, DOC < 0.1 mg L $^{-1}$).

2.2. Samples preparation and irradiation

Stock solutions of CD and of P were prepared by dissolving the required mass of solid in 50 mL of acetonitrile. They were kept in the dark until use. Solutions containing CD (5×10^{-5} to 7×10^{-4} M) and P (10^{-5} M) were excited at 365 nm in a quartz cell (1 cm path length) using a 200 W mercury arc lamp equipped with a Schoeffel monochromator. For solutions deoxygenation, argon was bubbled for 15 min in the cell before irradiation. Then, the cell was tightly closed with a valve system. The acetonitrile volatilization during deoxygenation was controlled by monitoring the absorbance of P after bubbling. Concentrations of CD were recalculated using P as an internal standard. Losses of acetonitrile laid generally within the range of 5–10%. Photodegradation of CD was also investigated on pure paraffinic wax films and on wax films containing phenalenone using the protocole previously described (Ter Halle et al., 2006). Pure wax films were made by adding

directly 0.8 g of wax in each dish and by heating them at 90 °C to achieve film formation. Wax films containing phenalenone were prepared by adding the required mass of sensitizer (3.2–7.6 mg) in the wax (40 g) and by melting the mixtures at 90 °C. Then, molten mixtures were poured in the dishes (0.8 g in each) and allowed to cool down. Films of phenalenone-containing wax were therefore at $8 \times 10^{-3}\%$ and $1.9 \times 10^{-2}\%$ w/w. To check the absence of P outside the wax films, we rinsed the wax surface using acetonitrile and analyzed these solutions by mass spectrometry. No traces of P were found in these controls. Concentrations of CD were chosen according to the recommendations for field applications (between 200 and 400 g ha $^{-1}$). The applied rates on films were set within these ranges. CD solutions in acetonitrile (5.8×10^{-5} M) were deposited on top of wax films (0.85 mL for dishes of 3.2 cm diameter). Acetonitrile was allowed to evaporate overnight. After drying, the surface concentration of CD was 2×10^{-2} g m $^{-2}$. Wax films were irradiated in a Suntest CPS photosimulator (Atlas) equipped with a Xenon lamp filtrated below 290 nm. The intensity of the lamp was set at 500 W m $^{-2}$, simulating the sunlight average intensity in summer in France. Cold water (16 °C) was flowed through the bottom of the photosimulator to maintain the internal temperature as low as possible. After irradiation, films were rinsed with 0.85 mL of acetonitrile, and samples were analyzed by HPLC. For each irradiation times as well as for the initial time, four dishes were used so that each data was the average of four experimental values. On wax films, CD decay followed a first-order kinetic; only the half-lives are given in the text. They have been obtained by linearization. For experiments with FFA, 3 mL of a solution at 10^{-4} M was deposited on a pure wax or on a wax film containing 7.6% w/w of P. The solutions were irradiated in the Suntest for 1 h; a filter (Schmelze 338676 cutting off 50% of radiations below 349 nm) was added on the solution to prevent direct photolysis of FFA. FFA losses and pyranone product formation were determined by HPLC (Nucleodur column, 15% MeOH, and 85% of acidic water).

2.3. Methods

UV–visible spectra were recorded on a Cary 3 (Varian) spectrophotometer. Potassium ferrioxalate was used as a chemical actinometer (Calvert and Pitts, 1966). Transient absorption spectroscopy was carried out on a nanosecond laser-flash photolysis spectrometer from Applied Photophysics (LKS.60) with laser excitation at 355 nm from Quanta-Ray GCR130-1 Nd:YAG laser. Experimental details are described elsewhere (Bonnichon and Richard, 1998). All solutions were deoxygenated directly in the cell under an argon flow. The formation and decay of ${}^3\text{P}^*$ were monitored at 450 nm; at this wavelength, the extinction coefficient of P is negligible ($\epsilon < 80$ M $^{-1}$ cm $^{-1}$). To investigate the quenching of ${}^3\text{P}^*$ by CD, we measured the triplet decay in the presence of various CD concentrations (between 10^{-3} and 6×10^{-3} M). HPLC–UV analyses were performed at room temperature using a system equipped with an autosampler (Waters 717plus), a degasser (Agilent 1100 series), a pump (Waters 515) and a photodiode array detector (Waters 996). The reversed-phase column was a NUCLEODUR C18 (150 mm long, 4.6-mm internal diameter, and 5- μ m particle size) supplied by Macherey–Nagel and the injection volume was 30 μ L. The flow rate was set at 1 mL min $^{-1}$ and elution was carried out in the gradient mode. The mobile phase composition started with 50% water (acidified with formic acid, 0.5% v/v) and 50% acetonitrile and was kept for 3 min. The percentage of acetonitrile was increased linearly to 80% over 6 min and then kept constant during 6 min. The mobile phase was then returned to 50% acetonitrile in 3 min and kept for 3 min. CD was monitored at 280 nm with the retention time of 16.5 min.

The MS system consisted of an LC/QTOF equipped with an orthogonal geometry Z-spray ion source was used (Waters/Micromass,

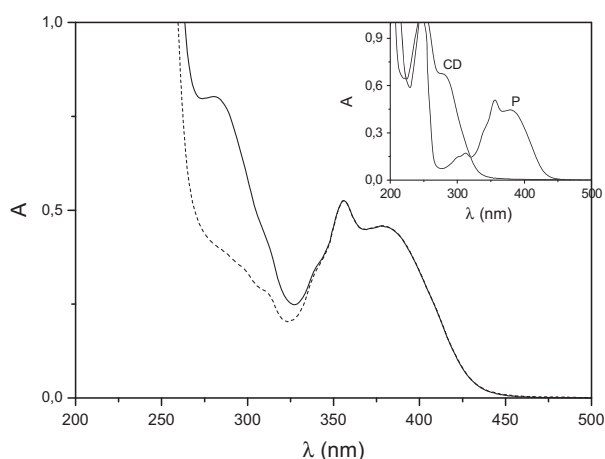


Fig. 2. Absorption spectrum of a mixture of CD (10^{-4} M) and P (5×10^{-5} M) in air-saturated solution: before irradiation (solid line) and after 20 min of irradiation (dash line). Insert: Absorption spectra of CD (10^{-4} M) and P (5×10^{-5} M) in acetonitrile.

Manchester, UK). A photodiode array detector Waters Alliance 2695 system was used for UV detection. A volume of 25.0 μ L was injected on a reversed-phase column (X terra, Waters, C_{18} , 3.5 μ m, 100 mm \times 2.1 mm). A flow rate of 0.2 mL min^{-1} was set. The binary solvent system used was composed of solvent A (acetonitrile) and solvent B (water acidified with 0.5% v/v formic acid). The gradient elution started with 5% A and reached 95% A in 15 min linearly. The gradient was held for 10 min and then decreased to 5% A in 10 min. The desolvation chamber and ion source block temperatures were set at 250 and 100 $^{\circ}\text{C}$, respectively. N_2 was used as the nebulizer gas (35 L h^{-1}) and the desolvation gas (350 L h^{-1}). The electrospray interface was operating in positive ion mode. The capillary voltage was 3000 V; the sample cone and the extraction cone were set at 35 V and 1 V respectively. Data were acquired over the m/z 90–1000 range at a scan rate of one second per spectrum. The data recorded was processed with MassLynx (version 4.0). The quantum yields of CD photodegradation, Φ_{CD} , were obtained using the relationship:

$$\Phi_{\text{CD}} = \frac{\Delta \text{CD} / \Delta t \times 6.02 \times 10^{23} \times \ell \times 10^{-3}}{I_0 \times (1 - 10^{-A_p})} \quad (1)$$

where ΔCD was the loss of CD (in M) during Δt (in s), ℓ was the path length (in cm), I_0 was the photon fluence rate (in photon $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) and A_p was the absorbance of P at 365 nm. At 365 nm, CD was photostable, thus the loss of CD was essentially to photosensitization. Consequently, Φ_{CD} represented the quantum yield of photosensitized reaction and was calculated based on the absorbance of the photosensitizer P.

3. Results and discussion

3.1. Sensitized phototransformation of CD – Role of oxygen

The absorption spectrum of a mixture of P (5×10^{-5} M) and CD (10^{-4} M) is given in Fig. 2. Above 350 nm, the absorption is mainly due to P (see insert of Fig. 2) which can be thus quite selectively excited at 365 nm in P-CD mixtures. Nevertheless, we checked the photostability of CD upon irradiation at this wavelength. To achieve this, acetonitrile solutions of CD (10^{-4} M) were irradiated for 20 min at 365 nm and analyzed by HPLC. Negligible losses of CD were observed confirming the absence of direct photolysis in the chosen experimental conditions.

Then, solutions containing CD and P were irradiated at 365 nm to investigate sensitized reaction. After 20 min of irradiation,

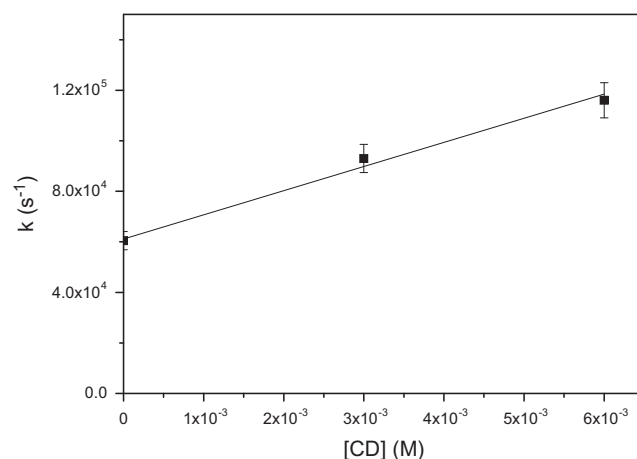


Fig. 3. Quenching of phenalenone triplet by CD in oxygen-free acetonitrile. The slope is $9.6 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ and R^2 is 0.98.

argon-saturated solutions did not show any evolution as monitored by UV spectroscopy while significant absorbance decreases between 250 and 350 nm were observed for air-saturated solutions (Fig. 2). This decrease is attributed to CD losses because the absorbances of P in the wavelength range 350–460 nm remained unchanged. HPLC measurements confirmed that CD was consumed in aerated solutions (loss of 70% after 20 min) but stable in deoxygenated solution. The quantum yield of CD loss through sensitized reaction (Φ_{CD}) was found to 0.025 ± 0.003 after a conversion extent of 15%. P was stable whatever the oxygen concentration of the solutions.

3.2. Reactivity of CD with $^3\text{P}^*$

To determine whether CD do react with $^3\text{P}^*$, we conducted laser-flash photolysis experiments. The wavelength excitation was set at 355 nm and $^3\text{P}^*$ decay was monitored at 450 nm. In oxygen-free solution, the first order rate constant decay of $^3\text{P}^*$, k , was equal to $(6.0 \pm 0.9) \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ while in air-saturated solution to $(6.5 \pm 0.5) \times 10^6 \text{ s}^{-1}$. Based on a concentration of dioxygen in air-saturated acetonitrile of $2.4 \times 10^{-3} \text{ M}$ (Franco and Olmsted, 1990), and to the relationship $k = k_d + k_{\text{O}_2} [\text{O}_2]$ where k_d was the rate constant of $^3\text{P}^*$ deactivation (process 1) and k_{O_2} , the bimolecular rate constant of $^3\text{P}^*$ quenching by oxygen (process 2), k_{O_2} was estimated at $(2.7 \pm 0.3) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Then, $^3\text{P}^*$ decay was monitored in oxygen-free solution in the presence of various CD concentrations and k was plotted against CD concentration. The plot was linear (Fig. 3) in accordance with the relationship: $k = k_d + k_{\text{CD}} [\text{CD}] + k'_{\text{CD}} [\text{CD}]$, where k_{CD} was the bimolecular rate constant of $^3\text{P}^*$ reduction by CD (process 3) and k'_{CD} was the bimolecular rate constant of $^3\text{P}^*$ deactivation by CD (process 3') (see Fig. 1). The slope gave $k_{\text{CD}} + k'_{\text{CD}} = (9.6 \pm 1) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, considering 10% error margin. One tried to observe the formation of $\text{P}^{\cdot-}$, possibly formed through electron transfer from CD to $^3\text{P}^*$, by monitoring at 440 nm the transient absorption at the end of the laser pulse. Although this radical anion strongly absorbs (Flors and Nonell, 2004) we could not detect it. Either $^3\text{P}^*$ reduction was a very minor pathway or the reduction proceeded by H transfer yielding preferentially $\text{P}_\text{H}^{\cdot}$ which absorbs much less than $\text{P}^{\cdot-}$ and is more difficult to detect. This is thus possible that the scavenging of $^3\text{P}^*$ by CD is partly deactivation.

The quantum yield of CD photodegradation in the presence of P is the sum of two terms, one corresponding to the oxidation of CD by $^3\text{P}^*$ (Φ_3) and the other to the reaction of CD with singlet oxygen (Φ_4):

$$\Phi_{\text{CD}} = \Phi_3 + \Phi_4 \quad (2)$$

Φ_3 was equal to $\Phi_{isc} k_{CD} [CD] / (k_d + k_{CD} [CD] + k'_{CD} [CD] + k_{O_2} [O_2])$. For the highest CD concentration used (7×10^{-4} M), and for the highest possible k_{CD} value ($9.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), one gets $\Phi_3 \sim 10^{-3}$ which is negligible behind Φ_{CD} (0.025). Consequently, we can write that $\Phi_{CD} = \Phi_4$.

3.3. Singlet oxygen pathway

To confirm the reactivity of CD with 1O_2 we carried out quenching experiments, using β -carotene as a singlet oxygen quencher ($k_q = 8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Krasnovsky and Kagan, 1979) (process 5). At 10^{-5} M and above, β -carotene drastically inhibited the reaction, as expected. Then, we measured the rate constant of process 4. Φ_{CD} , equal to Φ_4 , could be written:

$$\Phi_{CD} = \Phi_A \cdot \frac{k_r [CD]}{k_d + k_r [CD]} \quad (3)$$

where k_d was the decay rate constant of singlet oxygen in acetonitrile and k_r the reaction rate constant of CD with 1O_2 . Solutions of P (10^{-5} M) containing increasing concentrations of CD (5×10^{-5} – 7×10^{-4} M) were irradiated at 365 nm and Φ_{CD} was measured. Plotting $1/\Phi_{CD}$ against the reciprocal of the CD concentration was linear (see Fig. 4). The slope was equal to 3.4×10^{-3} M. Based on the value of $k_d = (3.3 \pm 0.7) \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ (Merkel and Kearns, 1972) and $\Phi_A = 0.98$ in acetonitrile, we got $k_d/k_r = 3.3 \times 10^{-3}$ M and $k_r = (1.0 \pm 0.2) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

3.4. Steady state irradiations of CD on films

In a second step, we aimed to mimic conditions taking place at the plant surface by irradiating CD deposited on wax films in which the sensitizer P was included. As irradiations were performed in a sunlight simulator and CD absorbed photons within the wavelength range 290–350 nm (insert of Fig. 2), we first measured its rate of direct photolysis upon irradiation on pure wax film. In the absence of P, the half-life of CD was 2 h. Then, we investigated the phototransformation of CD on films containing P in order to determine whether singlet oxygen produced through sensitization inside the film was able to react with CD. The amount of P added into the wax was chosen using the literature data. Indeed, Kamo et al. (2000) induced the production of phenalenone phytoalexins in banana plant by wounding or inoculating the fruits with a fungal suspension. The phytoalexin production in the whole fruit reached $49 \mu\text{g}$ per gram of fresh weight of peel ($\sim 5 \times 10^{-3}\%$ w/fw). Considering that the concentration of phenalenone phytoalexins is probably higher in the cuticle and epidermal cells because they are

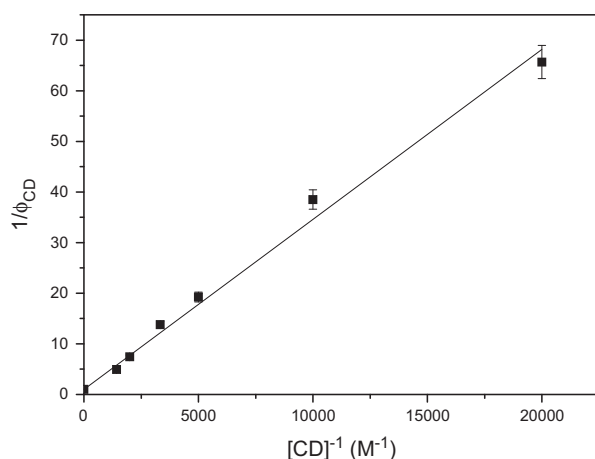


Fig. 4. Plot of $1/\Phi_{CD}$ against $[CD]^{-1}$ using phenalenone as a sensitizer. The slope is 3.4×10^{-3} M and R^2 is equal to 0.99.

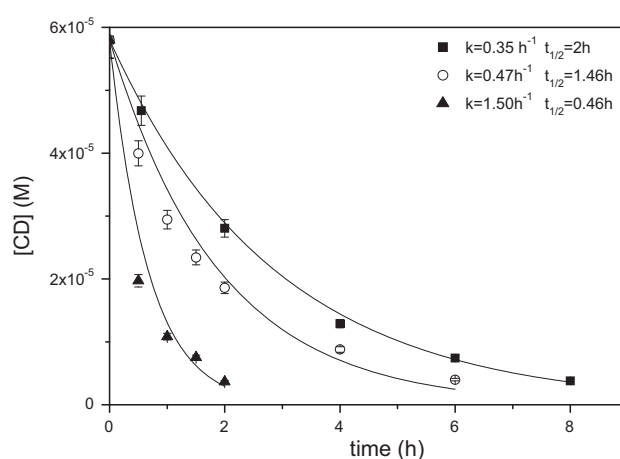


Fig. 5. Photodegradation of CD on paraffin wax under simulated sunlight irradiation as a function of irradiation time. The CD surface concentration is set at 200 g ha^{-1} . ■ pure paraffin wax; ○ paraffin wax containing $8 \times 10^{-3}\%$ w/w P; ▲ paraffin wax containing $1.9 \times 10^{-2}\%$ w/w P.

mainly synthesized in epidermal cells (Downum and Nemec, 1987; Berenbaum and Larson, 1988; Flors and Nonell, 2006), we chose the concentration range $(8\text{--}20) \times 10^{-3}\%$ w/w. The presence of P inside the wax had a significant increasing effect on the CD photodegradation (Fig. 5). The half-life was 1.46 h on P-wax $8 \times 10^{-3}\%$ w/w and 0.46 h on P-wax $2 \times 10^{-2}\%$ w/w compared to 2 h on pure wax. To determine whether singlet oxygen produced by P inside the film was able to reach the surface for oxidizing CD, we undertook additional experiments using FFA as a singlet oxygen quencher (Haag et al., 1984). The loss of FFA was significant (38%) as well as the formation of its photoproduct (a pyranone derivative). This experiment confirmed that oxidation of chemicals deposited at the surface of the films by singlet oxygen produced by P inside the film was possible. This is the likely pathway of CD phototransformation. The possibility of CD to react with singlet oxygen in our conditions is linked to several parameters: a concentration of oxygen in the wax sufficient to ensure the production of singlet oxygen, a lifetime of singlet oxygen in the wax long enough for giving this species the time to reach the film surface. Waxes show permeability to oxygen (Donhowe and Fennema, 1993), thus production of singlet oxygen inside the wax is possible. Concerning the lifetime of singlet oxygen in the wax, no data are available. This is consequently difficult to say if CD is oxidized by singlet oxygen produced very close to the surface or more deeply inside the film. Additional experiments are needed to document this question. In real conditions, the reactivity of CD with singlet oxygen should be highly dependent on the oxygen concentration in the cuticle, because energy transfer from triplet sensitizers to oxygen will compete with triplet reduction by all the reductive molecules also present in the cuticular wax.

3.5. Photoproducts identification

No transformation products were detected in dark control experiments, evidencing the stability of CD in aprotic solvents. In contrast, the 365-nm irradiated solutions of CD (10^{-4} M) and P (5×10^{-5} M) in acetonitrile gave the HPLC–UV–MS in the positive mode shown in Fig. 6. Compounds detected were $[CD + H]^+$ ($m/z = 326$), $[P + H]^+$ ($m/z = 181$), $[CD + O + H]^+$ ($m/z = 342$) and $[CD + 2O + H]^+$ ($m/z = 358$). Two peaks corresponded to $m/z = 342$ indicating the presence of isomers. The photoproducts corresponding to this mass may result from the oxidation of S into S=O or to the oxidation of the cyclohexen-1-one ring. They are noted CD + O. The photoproduct corresponding to $m/z = 358$ can result

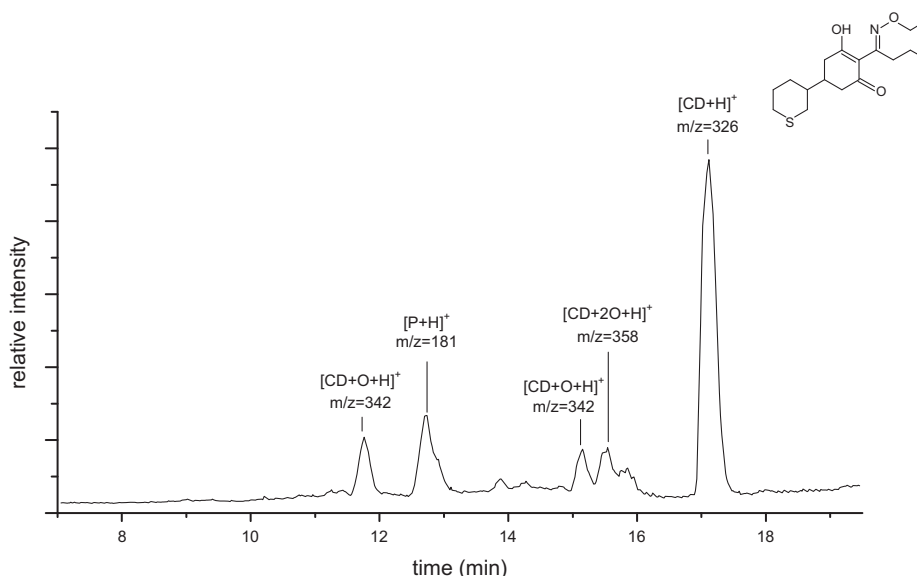


Fig. 6. HPLC–MS chromatogram of a CD–P solution irradiated at 365 nm.

from the oxidation of S into SO₂, or to the oxidations of S into SO and of the cyclohexen-1-one ring. Based on the literature data, we suggest that the oxidation of CD was more likely to be on the S atom than on the cyclohexen-1-one moiety of the molecule (Clennan and Pace, 2005).

HPLC–UV–MS chromatograms of samples irradiated on wax were more complex, because these samples were irradiated in polychromatic light and both direct and photosensitized photoreactions occurred. These samples were prepared at equivalent CD conversion extent than samples in solution. On pure wax, compounds detected were: [CD + H]⁺ (*m/z* = 326), [CD + O + H]⁺ (*m/z* = 342), [CD-ethoxy + H]⁺ (*m/z* = 282) and [CD + O-ethoxy + H]⁺ (*m/z* = 298). Photoproduct with *m/z* = 282 corresponds to the loss of the ethoxy group on the oxime moiety of CD and that with *m/z* = 298 to the loss of the ethoxy group and the addition of an oxygen atom on CD. Photoproducts were thus different from those obtained through singlet oxygen pathway. In particular, direct photolysis led to loss of the ethoxy group. In wax containing P, we detected all the above-mentioned photoproducts and additionally [CD + 2O + H]⁺ (*m/z* = 358).

4. Conclusion

Using phenalenone as photosensitizer, the ability of singlet oxygen to oxidize CD was demonstrated and measured in acetonitrile. CD also quenches the sensitizer triplet excited state, but the reaction rate is quite small. When the singlet oxygen sensitizer is inside the wax film and CD above, oxidation of CD by singlet oxygen also occurs. Thus in real conditions CD sprayed on crops might be subject to sensitized reactions, along with direct photolysis. These sensitizing reactions are expected to depend on several parameters such as the capacity of plants to generate photosensitizing phytoalexins near the surface or the oxygen concentration in the cuticle. Several photoproducts result from the singlet oxygen CD oxidation. Oxidation takes place preferentially on S atom and/or cyclohexene ring.

References

Berenbaum, M.R., Larson, R.A., 1988. Flux of singlet oxygen from leaves of phototoxic plants. *Experientia* 44, 1030–1032.

- Bidleman, T.F., 1988. Atmospheric processes: wet and dry deposition of organic compounds are controlled by their vapor-particle partitioning. *Environ. Sci. Technol.* 22, 361–367.
- Bonnichon, F., Richard, C., 1998. Phototransformation of 3-hydroxybenzoxazole in water. *J. Photochem. Photobiol. A* 119, 25–32.
- Calvert, J.G., Pitts, J.N., 1966. *Photochemistry*. New York.
- Clennan, E.L., Pace, A., 2005. Advances in singlet oxygen chemistry. *Tetrahedron* 61, 6665–6691.
- Donhowe, G., Fennema, O., 1993. Water vapor and oxygen permeability of wax films. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70, 867–873.
- Downum, K.R., Nemec, S., 1987. Light activated pesticides. Heitz, J., Downum, K.R. (Eds.), American Chemical Society Symposium Series 281, 339.
- EFSA, 2010. Conclusion on pesticide peer review. *EFSA J.* 8 (1669), 10–11.
- Eyheraguibel, B., Ter Halle, A., Richard, C., 2009. Photodegradation of Bentazon, Clopyralid, and Triclopyr on model leaves: importance of a systematic evaluation of pesticide photostability on crops. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1960–1966.
- Flors, C., Nonell, S., 2004. Radical species derived from phenalenone: characterization and role of upper excited states. *J. Photochem. Photobiol. A* 163, 9–12.
- Flors, C., Nonell, S., 2006. Light and singlet oxygen in plant defense against pathogens: phototoxic phenalenone phytoalexins. *Acc. Chem. Res.* 39, 293–300.
- Franco, C., Olmsted, J.L., 1990. Photochemical determination of the solubility of oxygen in various media. *Talanta* 37, 905–909.
- Haag, W., Hoigne, J., Gassman, E., Braun, A., 1984. Singlet oxygen in surface waters – Part II: quantum yields of its production by some natural humic materials as a function of wavelength. *Chemosphere* 13, 641–650.
- Kamo, T., Hirai, N., Tsuda, M., Fujioka, D., Ohigashi, H., 2000. Changes in the content and biosynthesis of phytoalexins in banana fruit. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 2089–2098.
- Katagi, T., 2011. Photodegradation of pesticides on plant and soil surfaces. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 182, 1–195.
- Koch, K., Ensikat, H.-J., 2008. The hydrophobic coatings of plant surfaces: epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly. *Micron* 39, 759–772.
- Krasnovsky, A.A., Kagan, V.E., 1979. Photosensitization and quenching of singlet oxygen by pigments and lipids of photoreceptor cells of the retina. *FEBS Lett.* 108, 152–154.
- Merkel, P.B., Kearns, D.R., 1972. Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. An experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 7244–7253.
- Midden, W.R., Wang, S.Y., 1983. Singlet oxygen generation for solution kinetics: clean and simple. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 4129–4135.
- Schmidt, R., Tanielian, C., Dunsbach, R., Wolff, C., 1994. Phenalenone, a universal reference compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen O₂(¹Δ_g) sensitization. *J. Photochem. Photobiol. A* 79, 11–17.
- Ter Halle, A., Drncova, D., Richard, C., 2006. Phototransformation of the herbicide sulcotrione on maize cuticular wax. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2989–2995.
- Ter Halle, A., Piquet, A., Richard, C., 2007. An actual scenario that demonstrates sulcotrione photodegradation on maize leaves after spraying. *Environ. Chem.* 4, 256–259.

3.4.2 Réaction en l'absence d'oxygène

Nous avons cherché à savoir si CD se dégradait sous irradiation en présence de phénalénone et en milieu désoxygéné. Une solution mélange de CD (10^{-4} M) et de P (5×10^{-5} M) préparée dans l'acétonitrile a été désoxygénée sous flux d'argon dans une cellule en quartz. La solution a ensuite été bouchée et irradiée à 365 nm pendant 20 minutes. Le spectre d'absorption avant et après irradiation est présenté Figure V.11. Cette figure est complémentaire à la Figure 2 de l'article. Parce que CD absorbe essentiellement en dessous de 350 nm, le spectre d'absorption du mélange avant et après irradiation indique qu'il n'y a aucune modification de CD.

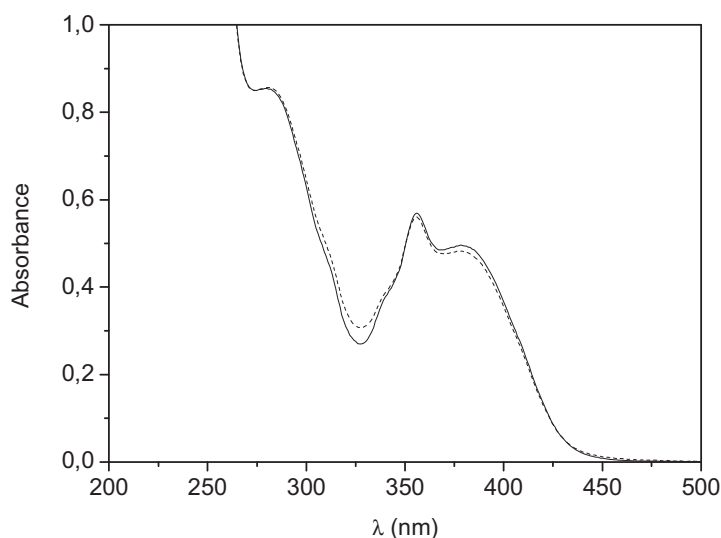


Figure V.11 : Spectre d'absorption d'une solution de CD et de P à 10^{-4} et 5×10^{-5} M respectivement dans l'acétonitrile désoxygéné, avant (en trait plein) et après (en pointillé) irradiation.

L'absorption au dessus de 350 nm correspond à la phénalénone. On peut observer une légère diminution de l'absorption de P en absence d'oxygène, ce qui confirme qu'elle se phototransforme de façon minime au cours de l'expérience. Ce phénomène a déjà été observé dans la littérature²⁰. Les solutions ont également été analysées par HPLC-DAD. Aucune conversion de CD n'a été mesurée.

3.4.3 Réaction de CD avec $^1\text{O}_2$ dans l'eau.

La constante de vitesse de réaction de CD avec l'oxygène singulet (k_r) a également été mesurée l'eau. La procédure pour mesurer k_r est décrite au paragraphe 3.3 de l'article. La pente obtenue pour le tracé de $1/\Phi_{\text{CD}}$ en fonction de $[\text{CD}]^{-1}$ à la Figure V.12 est égale à $k_d/(\Phi_{\Delta} \times k_r)$. La valeur de cette pente est de $3,4 \times 10^{-3}$ M dans l'acétonitrile et de $4,2 \times 10^{-3}$ M dans l'eau. Sachant que k_d vaut $(1,7 \pm 0,1) \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ dans l'acétonitrile (Oliveros, E.; communication personnelle) et $(2,4 \pm 0,1) \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ dans l'eau²¹ et que Φ_{Δ} vaut $0,98 \pm 0,08$ dans ces deux solvants²², on trouve $k_r = (5,1 \pm 0,2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ dans l'acétonitrile et $(5,8 \pm 0,2) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ dans l'eau. Ce résultat indique que la réaction entre CD et $^1\text{O}_2$ est plus rapide dans l'eau que dans l'acétonitrile. Bien que le temps d'irradiation des solutions soit faible (5

min), il conviendrait de vérifier que cette différence de réactivité de CD dans l'eau et dans l'acétonitrile ne soit pas attribuée à l'hydrolyse de la molécule dans l'eau.

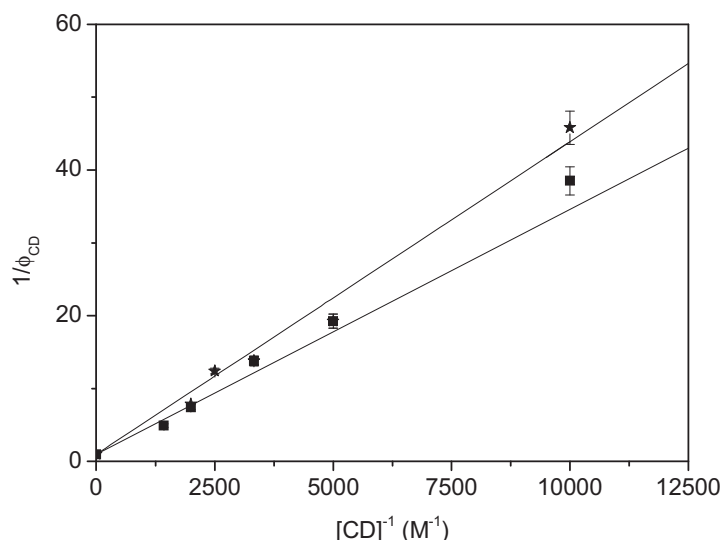


Figure V.12 : Tracé de $1/\Phi_{CD}$ en fonction de $[CD]^{-1}$ en utilisant P comme sensibilisateur. La pente de la droite obtenue dans l'eau est de $4,2 \times 10^{-3} \text{ M}$ (★) contre $3,4 \times 10^{-3} \text{ M}$ dans l'acétonitrile (■).

3.4.4 Synthèse de l'article et des expériences complémentaires

Les études en irradiation continue dans l'acétonitrile sous air et sous argon et en présence ou non de β -carotène démontrent que CD réagit avec 1O_2 . La constante de vitesse de réaction est égale à $5,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Les mesures par photolyse laser flash ont également montré que le triplet de la phénalénone est désactivé par CD et réagit avec CD, la constante de vitesse de réaction étant évaluée à $9,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Dans l'eau la constante de vitesse de réaction entre CD et 1O_2 est égale à $5,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Ensuite, nous avons mesuré la vitesse de phototransformation de CD sur des films de cire pure ou contenant différentes concentrations de phénalénone. Les résultats indiquent que la disparition de CD est plus rapide en présence de P que sur les films de cire pure. L'augmentation de la vitesse de phototransformation de CD avec la concentration de phénalénone dans le film suggère fortement l'implication de l'oxygène singulet dans la dégradation de CD. Nous pouvons donc constater que la phototransformation de la substance active sur film de cire pure déjà extrêmement rapide ($t_{1/2} = 2 \text{ h}$) s'accroît *via* les réactions sensibilisées lorsque les films contiennent la phénalénone.

4. Photoréactivité de la cycloxydime en phase solide

Les expériences sur support solide présentées dans cette partie sont des études cinétiques qui permettent d'évaluer la photodégradation directe de CD sur les cultures. Il n'est pas possible de réaliser des expériences en champs car le taux d'ensoleillement, la température, la pluviosité et les autres facteurs varient en fonction de la période de l'année ou de la journée. Les expériences ont donc été menées au laboratoire dans des conditions les plus proches des conditions environnementales. Les études sur support solide ont été principalement effectuées sur les films de cire afin de modéliser la surface foliaire. Quelques expériences complémentaires ont été réalisées sur des feuilles de tabac détachées. La plante de tabac a été utilisée parce qu'elle peut-être traitée par les formulations de CD mais aussi pour sa disponibilité au laboratoire de biologie.

CD a été déposé sur les films de cire ou sur les feuilles de tabac à des concentrations surfaciques identiques à celles des doses agricoles. Les échantillons ont été irradiés dans un simulateur de lumière solaire et ont ensuite été rincés puis analysés par HPLC-DAD. Dans cette section, nous avons étudié l'influence de : la nature du solvant de dépôt, du volume de dépôt et de la taille des gouttes, de la formulation, de la nature du support et des résidus de chlorothalonil sur la cinétique de photodégradation de CD.

Puisque toutes les irradiations ont été réalisées dans un simulateur de lumière solaire et que le flux photonique de la lampe était identique pour chaque expérience, nous pouvons comparer les constantes de vitesse mesurées. De plus, nous pouvons aussi de cette manière déterminer la durée de demi-vie de phototransformation de la molécule. Cette dernière est très utilisée pour évaluer le devenir des pesticides dans l'environnement.

4.1 Influence de la nature du solvant utilisé pour le dépôt

Dans un premier temps, les taux de volatilisation et de pénétration de la substance active dans le film de paraffine ont été mesurés en absence de lumière. Le taux de volatilisation et de pénétration relevés dans nos conditions expérimentales sont de 10 % au bout de 2 jours. La molécule est pourtant très peu volatile¹.

Lors de la préparation des échantillons sur support solide, une solution de CD est déposée sur le film de cire. Nous avons voulu vérifier si le solvant initial avait une influence sur la cinétique de photodégradation de la molécule. Les solutions de CD ont été préparées soit dans l'acétonitrile, soit dans l'eau tamponnée à pH 3 et 7. Les solutions ont été ensuite déposées sur les films de cire de manière à atteindre une concentration surfacique de 200 g/ha qui correspond à la dose agricole. Après évaporation du solvant, les échantillons sont irradiés au Suntest à 500W m⁻². La cinétique pour ces trois expériences est donnée Figure V.13. Les constantes de vitesse de photodégradation relevées pour ces trois cinétiques sont très proches.

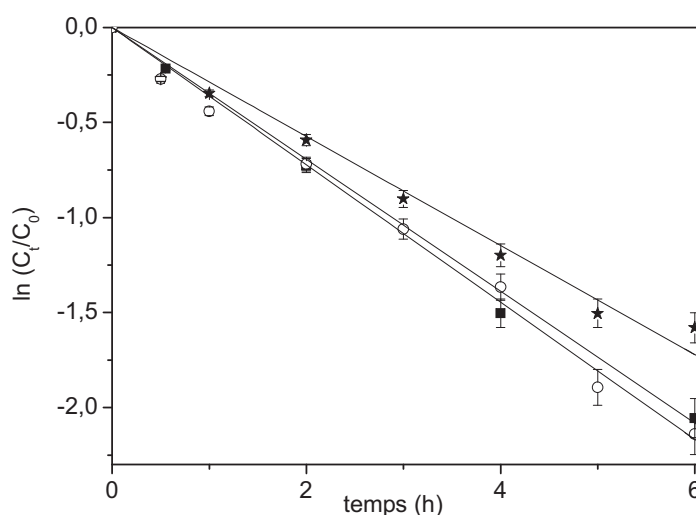


Figure V.13 : Cinétique de photodégradation de CD sur film de paraffine à 200 g/ha pour une solution de CD préparée dans l'eau à pH 3 (★, $k = 0,29 \text{ h}^{-1}$), à pH 7 (○, $k = 0,36 \text{ h}^{-1}$) et dans l'acétonitrile (■, $k = 0,35 \text{ h}^{-1}$).

4.2 Influence du volume de dépôt et de la taille des gouttes

Jusqu'à présent, la seule restriction imposée pour l'étude sur support solide était d'atteindre une concentration surfacique identique aux doses agricoles recommandées. Peu d'importance a été accordée au volume de dépôt. Pour faciliter la procédure expérimentale, les volumes de dépôt de solution étaient de l'ordre du millilitre. Or les solutions sont pulvérisées en champ sous forme de microgouttelettes qui se déposent à la surface de la plante. Il semble donc intéressant d'étudier l'influence du volume déposé et du mode de dépôt sur la vitesse de photodégradation de la molécule. Nous ne disposons pas de système de pulvérisation de microgouttelettes pouvant délivrer un volume de solution avec une haute précision. Les microgouttelettes ont donc été déposées manuellement avec une micropipette ayant une précision dans la gamme de 0,1 à 3 μl . La Figure V.14 compare les vitesses de photodégradation sur film de cire de CD à 200 g/ha déposé sous forme de dix gouttelettes de 2 μl (▲) (concentration de $250 \times 10^{-5} \text{ M}$) ou en un volume de 1 ml (△) (concentration de $5 \times 10^{-5} \text{ M}$), le nombre de molécules déposées étant le même au final.

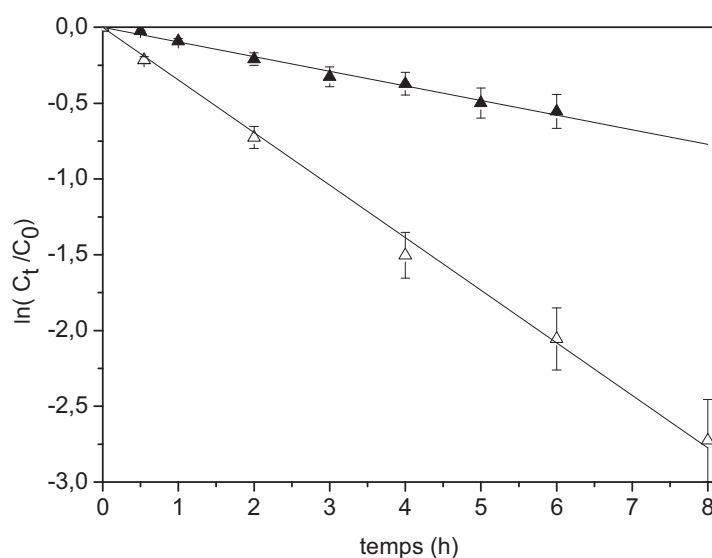


Figure V.14 : Cinétique de photodégradation de CD sur film de cire sous forme de gouttes de 2 µl (▲, $k = 0,096 \text{ h}^{-1}$) et d'un dépôt global de 1 ml (△, $k = 0,35 \text{ h}^{-1}$).

La vitesse est environ 3,6 fois plus grande lorsque le dépôt est de 1 ml. Dans le cas du dépôt en gouttes, seuls 20 µl sont déposés, la solution déposée est donc 50 fois plus concentrée que celle utilisée pour le dépôt de 1 ml. Les molécules sont donc plus entassées que dans le cas du dépôt de 1ml. Après l'évaporation du solvant, la molécule se retrouve sous forme d'amas beaucoup plus importants dans le cas des gouttes. Les molécules de pesticides sous forme d'amas absorbent sans doute moins le rayonnement. Ceci expliquerait que la vitesse soit plus lente lors du dépôt en microgouttelettes.

Pour étudier l'influence de la taille des gouttes, nous avons utilisé la formulation de CD, le Stratos ultra. Les conditions d'études sont ainsi plus proches des conditions environnementales. La formulation a été dissoute dans l'eau puis déposée sur les films de cire à une concentration surfacique de 200 g/ha. La Figure V.15 compare les vitesses de phototransformation du Stratos à 200 g/ha sur film de cire déposé sous forme de gouttelettes de 2 µl (○, $k = 0,43 \text{ h}^{-1}$) et de 1 µl (★, $k = 0,57 \text{ h}^{-1}$). Cette fois, nous avons utilisé la même solution si bien que nous avons déposé 10 gouttes de 2 µl et 20 gouttes de 1 µl. De cette manière, une plus grande surface est recouverte par le pesticide lors du dépôt à 1 µl. Il est logique que la photodégradation soit plus rapide quand les gouttelettes sont de plus petite taille. C'est effectivement ce que l'on observe.

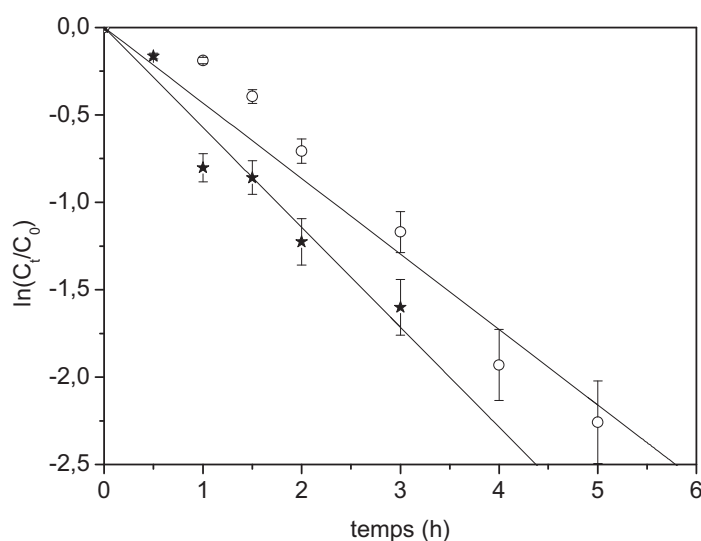


Figure V.15 : Cinétique de phototransformation du Stratos sur film de cire déposé sous forme de gouttes de 2 µl (○, $k = 0,43 \text{ h}^{-1}$) et de 1 µl (★, $k = 0,57 \text{ h}^{-1}$). 200 g/ha, Suntest 500 W m^{-2} .

4.3 Influence de la formulation

La cinétique de photodégradation de CD pur a été comparée à celle de CD formulé sous forme Stratos ultra sur film de paraffine (Figure V.16). Les concentrations surfaciques étaient de 200 g/ha dans les deux cas. La constante de vitesse de photodégradation est de $0,096 \text{ h}^{-1}$ pour CD pur (▲) et de $0,43 \text{ h}^{-1}$ pour le Stratos (○). Ce résultat montre que la vitesse de photodégradation de la molécule formulée est 4,5 fois plus rapide que celle de la molécule pure. L'augmentation de la vitesse de photodégradation en présence d'agent d'étalement ou des formulations a déjà été observée pour le chlorothalonil (chapitre III) et rapportée dans la littérature pour d'autres pesticides^{23,24}. Cet effet peut être attribué à un meilleur étalement du pesticide en présence d'adjuvants présents dans la formulation et par conséquent à une meilleure absorption de la molécule.

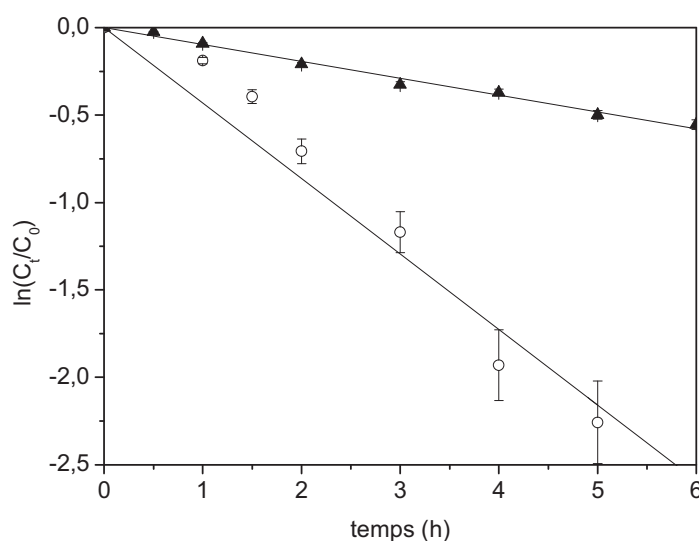


Figure V.16 : Cinétique de photodégradation sur film de cire de CD (▲, $k = 0,096 \text{ h}^{-1}$) et du Stratos (○, $k = 0,43 \text{ h}^{-1}$) à 200 g/ha déposés sous forme de gouttelettes de 2 μl .

4.4 Influence de la nature du support

Pour étudier l'influence de la nature du support, nous avons choisi de comparer les cinétiques de photodégradation du Stratos sur cire et feuille de tabac. Préalablement, le taux de pénétration du pesticide a été mesuré pour des feuilles de tabac coupées et conservées au noir. Aucune diffusion significative dans la feuille n'a été relevée au bout de deux jours dans nos conditions expérimentales.

Les solutions sont déposées sous formes de gouttes de 2 μl et la concentration surfacique est de 200 g/ha. Pour les expériences sur les feuilles de tabac détachées, six répliquats ont été réalisés pour chaque temps d'irradiation avec une durée maximale d'irradiation de 2 h. Au-delà de cette période la feuille n'est plus manipulable. La Figure V.17 montre la cinétique obtenue sur le film de cire et sur feuille de tabac.

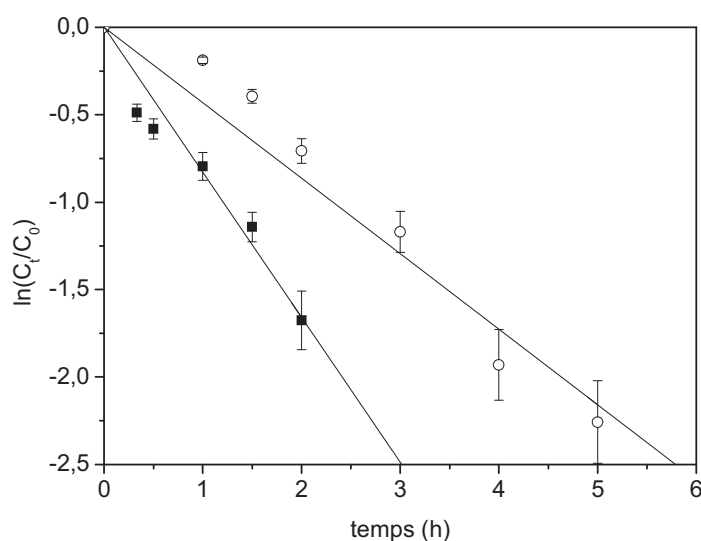


Figure V.17 : Cinétique de photodégradation du Stratos à 200 g/ha déposé à 2 μ l sur film de cire (O, $k = 0,43 \text{ h}^{-1}$) et sur feuille de tabac (■, $k = 0,83 \text{ h}^{-1}$).

La constante de vitesse de photodégradation est environ 2 fois plus grande sur feuille de tabac que sur film de cire. Ce résultat peut être attribué à différents facteurs :

- un meilleur étalement du composé si l'on considère que la feuille n'a pas une surface plane contrairement au film de cire et que les gouttes vont recouvrir une surface plus importante,
 - aux composés présents sur la feuille de tabac qui pourraient favoriser la photodégradation.
- Les feuilles de tabac sont recouvertes de micro-poils appelés trichomes qui peuvent sécréter des substances comme les terpènes et en particulier l' α et le β 4,8,13 divatriène -1,3 diol (^{25,26}). La Figure V.18 présente leur structure sans préciser la stéréochimie de la forme α et β . Ces constituants ont à la fois des doubles liaisons et des fonctions alcools qui peuvent accélérer la vitesse de phototransformation de la substance active du Stratos.

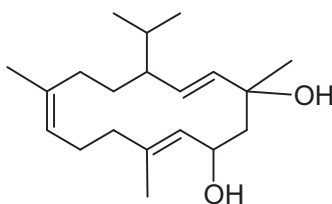


Figure V.18 : Structure du 4,8,13 divatriène -1,3 diol.

4.5 Effet de CT sur la photodégradation de la cycloxydime

Il arrive souvent qu'il y ait plusieurs traitements simultanés de pesticides sur une même culture et que deux ou trois pesticides soient associés au cours d'un épandage ou encore qu'une culture soit traitée avec différents phytosanitaires au cours de l'année. Nous avons choisi d'étudier l'effet des résidus de chlorothalonil (CT) sur CD. Il se trouve que ces deux pesticides sont employés sur les cultures de tomates, d'asperge, pois de conserve et pois protéagineux. Parce que ces deux composés sont des pesticides foliaires et que CT est un fongicide de contact à persistance, il semble intéressant d'étudier l'influence d'éventuels résidus de CT sur CD.

Afin de prendre un exemple proche des conditions agricoles, nous avons choisi d'utiliser les quantités recommandées sur la tomate, plante commune aux deux pesticides. Le Stratos ultra est une formulation de CD et le Fongil FL est une formulation de CT. Le Fongil est appliqué sur la tomate à 1500 g/ha et le Stratos à 200 g/ha. En supposant que des résidus de Fongil soient présents lors de l'application du Stratos, nous avons mesuré la vitesse de photodégradation du Stratos (200 g/ha) sur film de paraffine en présence de Fongil à 150g/ha (★) et 18 g/ha (☆), voir Figure V.19.

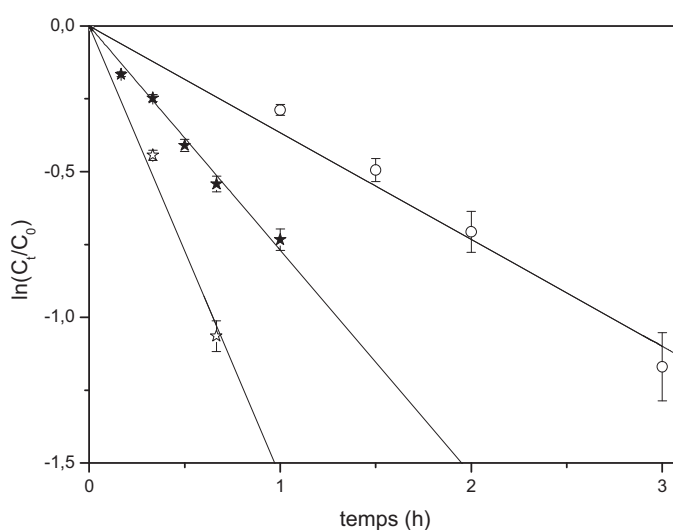


Figure V.19 : Cinétique de photodégradation du Stratos à 200 g/ha sur film de cire, déposé sous forme de gouttelettes de 2 μ l. seul (O, $k = 0,42 \text{ h}^{-1}$), en présence de Fongil à 18 g/ha (☆, $k = 0,77 \text{ h}^{-1}$) et en présence de Fongil à 150 g/ha (★, $k = 1,5 \text{ h}^{-1}$).

On peut constater que la constante de vitesse de photodégradation du Stratos est environ 2 fois plus grande en présence du Fongil à 18 g/ha et 3,5 fois plus grande lorsqu'il est présent à 150 g/ha. Ce résultat indique clairement que les résidus de CT accélèrent la vitesse de photodégradation du Stratos. CT a un rendement quantique de production d'oxygène singulet proche de l'unité (article du chapitre III), or CD est une molécule qui est réactive vis-à-vis de l'oxygène singulet (article du chapitre V). Ceci peut expliquer l'effet observé.

Les valeurs des constantes de vitesse de premier ordre apparent et les durées de demi-vie des expériences sur support solide en incluant celles de l'article « Reactivity of cycloxydim toward singlet oxygen in solution and on wax film » sont données au tableau V.2.

Tableau V.2 : Tableau récapitulatif des $t_{1/2}$ de CD à 200 g/ha.

solvant	substrat	support	volume (μl)	k (h⁻¹)	t_{1/2} (h)
tampon pH 3	CD	cire	1000	0,29	2,4
tampon pH 7	CD	cire	1000	0,36	1,9
acétonitrile	CD	cire	1000	0,35	2,0
acétonitrile	CD	cire	10×2	0,096	7,2
eau	Stratos	cire	10×2	0,43	1,6
eau	Stratos	feuille	10×2	0,83	0,8
eau	Stratos	cire	20×1	0,57	1,2
acétonitrile	Stratos + Fongil à 18 g/ha	cire	10×2	0,77	0,9
acétonitrile	Stratos + Fongil à 150 g/ha	cire	10×2	1,5	0,46
acétonitrile	CD	cire + P (8×10 ⁻³ %)	1000	0,47	1,47
acétonitrile	CD	cire +P (1,9×10 ⁻² %)	1000	1,5	0,46

5. Conclusion

La cycloxydime est susceptible de se trouver sous différentes formes du fait d'équilibres tautomériques céto-énol possibles sur les carbonyles du cyclohexane et de l'isomérisation possible de la fonction éther d'oxime (*E/Z*). Une étude par RMN nous a permis de déterminer que dans l'acétonitrile elle est majoritairement sous forme *E* et énol, stabilisée par une liaison intramoléculaire entre le OH de l'énol et l'azote de l'oxime.

Dans l'acétonitrile aéré, le rendement quantique de phototransformation mesuré à 334 nm est égal à $3,9 \times 10^{-2}$. La phototransformation sur cire est également assez rapide puisque le $t_{1/2}$ mesuré au Suntest à 500 Wm^{-2} n'est que de 2 h. Nous avons examiné l'influence de différents paramètres sur cette vitesse. Si la nature du solvant de dépôt a peu d'influence, en revanche le mode de dépôt impacte la vitesse. CD disparaît 3,5 fois plus vite si elle est déposée sous forme de solution plutôt que sous forme de gouttelettes de 2 μl . Sur cire CD formulée se phototransforme 4,5 fois plus vite que CD pure²⁴. Il est aussi intéressant de constater que la vitesse de CD formulée est 2 fois plus grande sur feuille de tabac que sur cire de paraffine. Ces différences significatives montrent l'importance de la distribution du pesticide à la surface du film sur sa vitesse de phototransformation.

L'objectif du travail était d'estimer le devenir de CD après application sur les plantes *via* les réactions sensibilisées. Parce que certaines plantes sont capables de synthétiser des phototoxines qui produisent $^1\text{O}_2$ en présence de lumière solaire, nous avons examiné la réactivité de CD avec $^1\text{O}_2$. Nous démontrons que CD réagit avec $^1\text{O}_2$ en solution comme en phase solide, avec le sensibilisateur à l'intérieur du film de cire. Par ailleurs, la présence de chlorothalonil qui est aussi un sensibilisateur de $^1\text{O}_2$ augmente la vitesse de phototransformation de CD. C'est ce que nous avons observé lorsque la formulation de CD est ajoutée à la formulation de CT présente sous forme de trace. Les réactions sensibilisées peuvent donc avoir une influence considérable sur le devenir des pesticides appliqués sur les plantes. La nature des photoproduits de réactions sera examinée au chapitre VII.

Références

1. Food and environment protection act. Evaluation on cycloxydim. **1985**.
2. Iwataki, I. Cyclohexanedione herbicides: their activities and properties. *Rational approaches to structure, activity and ecotoxicology of agrochemicals*. Draber, W., Fujita, T. CRC Boca Raton. **1992**, 397-426.
3. Sandín-España, P.; Llanos, S.; Magrans, J. O.; Alonso-Prados, J. L.; García-Baudín, J. M. Optimization of hydroponic bioassay for herbicide tepraloxym by using water free from chlorine. *Weed Res.* **2003**, *43*, 451-457.
4. Sevilla-Morán, B.; Sandín-España, P.; Vincente-Arana, M. J.; Alonso-Prados, J. L.; García-Baudín, J. M. Study of alloxym photodegradation in the presence of natural substances: elucidation of transformation products. *J. Photochem. Photobiol. A* **2008**, *198*, 162-168.
5. Curtin, D. Y.; Grubbs, E. J.; McCarty, C. G. Uncatalyzed syn-anti isomerization of imines, oxime ethers, and haloimines. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 2775-2786.
6. Falb, L. N.; Bridges, D. C.; Smith, A. E. Effects of pH and adjuvants on clethodim photodegradation. *J. Agri. Food Chem.* **1990**, *38*, 875-878.
7. Shoaf, A. R.; Carlson, W. C. Stability of sethoxydim and its degradation products in solution, in soil, and on surfaces. *Weed Sci.* **1992**, *40*, 384-389.
8. Shoaf, A. R.; Carlson, W. C. Analytical techniques to measure sethoxydim and breakdown products. *Weed Sci.* **1986**, *34*, 745-751.
9. McMullan, P. M. Grass herbicide efficacy as influenced by adjuvant, spray solution pH, and ultraviolet light. *Weed Technol.* **1996**, *10*, 72-77.
10. Sevilla-Morán, B.; Alonso-Prados, J. L.; García-Baudín, J. M.; Sandín-España, P. Indirect photodegradation of clethodim in aqueous media. By-product identification by quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Agric. Environ. Ethics* **2010**, *58*, 3068-3076.
11. Campbell, J. R.; Penner, D. Abiotic transformations of sethoxydim. *Weed Sci.* **1985**, *33*, 435-439.
12. Sevilla-Morán, B.; Mateo-Miranda, M. M.; Alonso-Prados, J. L.; García-Baudín, J. M.; Sandín-España, P. Sunlight transformation of sethoxydim-lithium in natural waters and effect of humic acids. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2010**, *90*, 487-496.
13. Hashimoto, Y.; Ishihara, K.; Soeda, Y. Fate of alloxym-sodium on or in soybean plants. *Pestic. Sci.* **1979**, *4*, 299-304.
14. Fiche technique du Devin. BASF. 2011. <http://www.basf-agro.fr>

15. Anderson, C. R. Cycloxydim- a new selective post-emergence herbicide for control of annual and perennial grasses in broad-leaved crops. Proceedings of the 9th Australian Weeds Conference. **1990**, 336-338.
16. Austrian Agency for Health and Food Safety. CLH report. Proposal for harmonised classification and labelling, based on regulation (EC) No 1272/2008. Cycloxydim. Annex VI. part 2.
17. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance cycloxydim. *EFSA journal* **2010**, 8, 1669.
18. Zawadiak, J.; Mrzyczek, M. UV absorption and keto-enol tautomerism equilibrium of methoxy and dimethoxy 1,3-diphenylpropane-1,3-diones. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2010, 75, 925-929.
19. Zawadiak, J.; Mrzyczek, M.; Piotrowski, T. Synthesis and properties of aromatic 1,3 diketones and bis(1,3 diketones) obtained from acetophenone and phthalic acids esters. *Eur. J. Chem.* **2011**, 2, 289-294.
20. Oliveros, E.; Bossmann, S. H.; Nonell, S.; Mart, C.; Heit, G.; Tröscher, G.; Neuner, A.; Martinez, C.; Braun, A. M. Photochemistry of the singlet oxygen [O₂] (¹Δ_g) sensitizer perinaphthenone (phenalenone) in N,N'-dimethylacetamide and 1,4-dioxane. *New J. Chem.* **1999**, 23, 85-93.
21. Rodgers, M. A. J. Solvent-induced deactivation of singlet oxygen: additivity relationships in nonaromatic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 6201-6205.
22. Schmidt, R.; Tanielian, C.; Dunsbach, R.; Wolff, C. Phenalenone, a universal reference compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen O₂ (¹Δ_g) sensitization. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1994**, 79, 11-17.
23. Lavieille, D.; Ter Halle, A.; Richard, C. Phototransformation of pesticides on plant leaves. Case of triketonic herbicides. Conference paper, *Environmental fate and ecological effects of pesticides*. **2007**, 160-167.
24. Lavieille, D.; Ter Halle, A.; Bussière, P.-O.; Richard, C. Effect of a spreading adjuvant on mesotrione photolysis on wax films. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 9624-9628.
25. Michie, M. J.; Reid, W. W. Biosynthesis of complex terpenes in the leaf cuticle and trichomes of nicotiana tabacum. *Nature* **1968**, 218, 578.
26. Keene, C. K.; Wagner, G. J. Direct demonstration of duvatrienediol biosynthesis in glandular heads of tobacco trichomes. *Plant Physiol.* **1985**, 79, 1026-1032.

CHAPITRE VI

PHOTOSENSIBILISATION PAR LES PHYTOALEXINES

1. Introduction

Nous avons montré aux chapitres IV et V qu'il existe des pesticides réactifs vis-à-vis de l'oxygène singulet en utilisant la phénalénone comme sensibilisateur. Pour se défendre contre les agresseurs, les plantes sont aussi capables de synthétiser des photosensibilisateurs générant de l'oxygène singulet. Ces composés produits par les plantes sont appelés phytoalexines ou phototoxines. Parce que cette forme réactive d'oxygène peut diffuser à travers la feuille¹ et que les pesticides sont directement appliqués sur les plantes, la présence des phytoalexines dans les feuilles peut accélérer la dissipation des pesticides sensibles à l'oxygène singulet. Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux réactions sensibilisées entre la cycloxydime (CD) et des phytoalexines.

Dans un premier temps, il a fallu choisir des phytoalexines qui produisent de l'oxygène singulet, ce qui n'est pas le cas de toutes. Pour faire ce choix, nous nous sommes basés sur une compilation des rendements quantiques de production d'oxygène singulet (Φ_{Δ}) des molécules biologiques². Nous avons sélectionné des molécules commercialement disponibles, présentes dans des variétés communes de plantes et ayant de préférence un $\Phi_{\Delta} > 0,1$ au moins dans un solvant organique. Au cours de cette thèse, cinq phytoalexines ont été choisies. Toutefois pour des raisons de solubilité, seules deux ont pu être étudiées de manière approfondie : la khellin (K) et le visnagin (V). Les Φ_{Δ} de ces deux molécules ont été mesurés dans des solvants organiques ainsi que dans la cire de paraffine pour imiter la cuticule des feuilles. Pour finir, la réactivité de K et V avec CD sous irradiation a été mesurée dans l'acétonitrile.

Ce chapitre est structuré comme suit : après une description des caractéristiques physico-chimiques décrites dans la littérature des deux molécules, nous avons abordé l'étude des transitoires en solution en présence de quelques capteurs. Puis, nous avons réalisé une étude cinétique de la phototransformation de CD en présence de V dans l'acétonitrile. Par ailleurs, nous avons mesuré les Φ_{Δ} de K et de V en solution dans l'heptane et l'acétonitrile et dans des films de cire en phase solide. Cette dernière partie est présentée sous la forme d'un article prêt à être soumis. Pour finir, nous décrivons la cinétique de photodégradation de CD sur des cires de paraffine contenant K et V.

2. Etude bibliographique

2.1 Généralités

Le visnagin et la khellin sont des furanochromones qui sont présents dans diverses parties d'une plante retrouvée dans la flore méditerranéenne, appelée *Ammi Visnaga* (L.)^{3,4}. En photochimiothérapie, ces deux composés sont associés aux rayonnements UVA pour le traitement des troubles dermatologiques comme le vitiligo⁴. Leur structure chimique est présentée Figure VI.1.

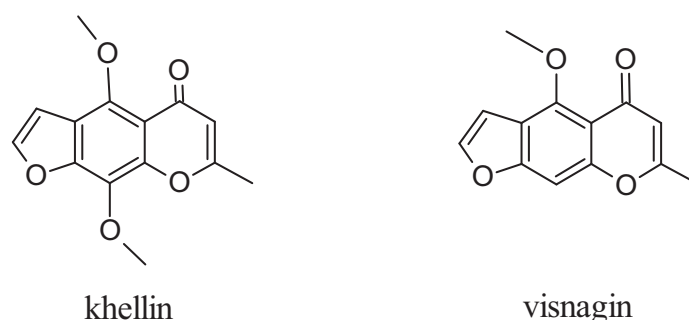


Figure VI.1 : Structure chimique de la khellin et du visnagin.

Ces composés sont des photosensibilisateurs à la fois de type I et II, V étant rapporté comme meilleur sensibilisateur que K⁵. Les rendements quantiques de fluorescence (Φ_F), de formation de triplet (Φ_T) et de production d'oxygène singulet (Φ_Δ) dans divers solvants sont donnés dans le Tableau VI.1.

Tableau VI.1 : Propriétés physico-chimiques de la khellin et du visnagin en fonction du solvant⁵.

Propriété en fonction du solvant	K	V
Φ_F dans le dioxane	0,0018	<0,0001
Φ_F dans l'acétonitrile	0,0147	<0,0001
Φ_F dans le méthanol	0,0024	0,065
Φ_F dans l'eau	0,0009	0,028
Φ_Δ dioxane	0,52	0,26
Φ_Δ cyclohexane	0,53	0,41
Φ_Δ eau deutérée	<0,03	<0,03
Φ_T dioxane	0,77	0,83
Φ_T cyclohexane	0,78	0,86

Les deux molécules fluorescent très peu. La principale voie de réaction du singlet est la transition inter-système. Le rendement quantique de peuplement du triplet est proche de 0,8. Ces molécules ont été peu étudiées dans l'eau pour des raisons de solubilité. Pour les deux molécules, Φ_{Δ} est nettement inférieur à Φ_T , ce qui signifie que la réaction des triplets avec l'oxygène ne donne pas seulement de l'oxygène singlet : il peut y avoir désactivation avec retour des molécules à l'état fondamental ou oxydo-réduction avec formation des radicaux-cations (voir Schéma VII.1). Dans le schéma ci-dessous, on dénommera k_d la constante de désactivation du sensibilisateur triplet ($^3S^*$), k_q sa constante de quenching due aux collisions entre le sensibilisateur et l'oxygène, k_{O_2} sa constante de réaction avec l'oxygène formant l'oxygène singlet et k_1 sa réaction avec l'oxygène conduisant à la formation des espèces radicalaires.

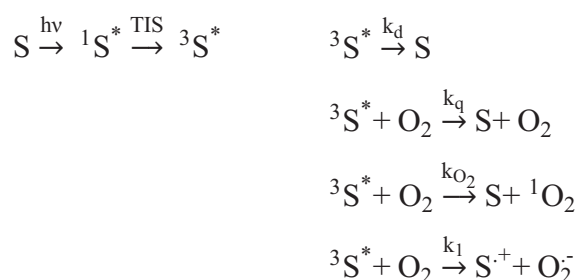


Schéma VII.1 : Réactions photochimiques impliquant un sensibilisateur (S) en présence d'oxygène.

Le Φ_{Δ} est défini comme étant le rapport du nombre de molécules d'oxygène singlet formées sur le nombre de photons absorbés par le sensibilisateur. Il peut être exprimé par l'équation suivante :

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_T \cdot \frac{k_{O_2} [O_2]}{k_d + (k_q + k_{O_2} + k_1)[O_2]}$$

Les deux phytoalexines ont des structures assez voisines et il est surprenant d'observer une aussi grande différence de réactivité. K porte un substituant OMe de plus que V et serait donc à priori plus donneur d'électron. Les spectres d'absorption de K et V dans l'acétonitrile et dans l'heptane sont présentés Figures VI.2a et VI.2b. L'heptane a servi une fois de plus de solvant modélisant les alcanes constituant les cuticules des plantes.

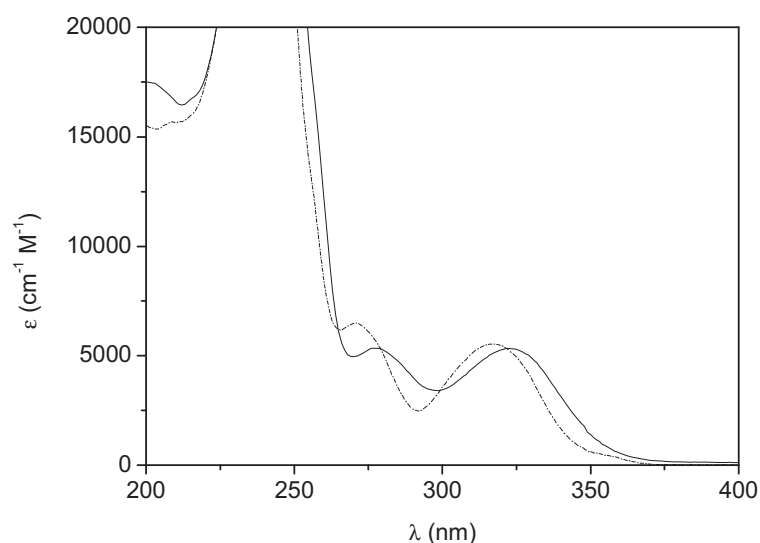


Figure VI. 2a : Spectres UV-Visible de K (trait plein) et V (pointillé) dans l'acétonitrile.

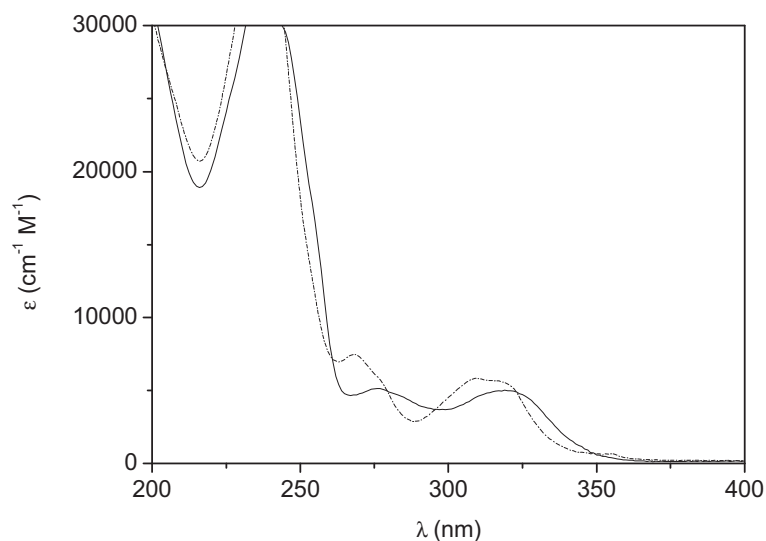


Figure VI. 2b : Spectres UV-Visible de K (trait plein) et V (pointillé) dans heptane.

On constate d'une part que les spectres UV-Visible de ces deux molécules sont très semblables, ce qui est cohérent avec des structures chimiques très proches. L'allure des spectres est aussi la même dans l'acétonitrile et dans l'heptane. Le spectre UV-Visible de K présente deux maxima dans l'acétonitrile : 278 nm et 323 nm ($\epsilon_{323\text{nm}} = 5310 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Dans l'heptane un petit effet hypsochrome est observé avec les maxima à 277 nm et 320 nm ($\epsilon_{320\text{nm}} = 5000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Le même phénomène est observé pour le visnagin dont les maxima sont de 271nm et 317 nm dans l'acétonitrile avec ($\epsilon_{317\text{nm}} = 5500 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) et de 270 nm et 310 nm dans l'heptane.

2.2 Données sur les espèces transitoires

Borges et al. ont tracé les spectres d'absorption triplet-triplet de K et V en milieu désoxygéné dans le benzène car c'est dans les solvants apolaires que le rendement quantique de formation de l'état triplet de ces deux espèces est le plus élevé⁵. Ces spectres sont donnés Figures VI.3 et VI.4. De plus, pour chaque molécule, le spectre d'absorption des radicaux cations est joint au spectre des triplets afin de faciliter la comparaison. Ces derniers spectres proviennent de la référence 4.

Le spectre de $^3K^*$ tracé dans le benzène désoxygéné (Figure VI.3) présente un maximum à 380 nm et un épaulement autour de 450 nm. L'absorbance en dessous de 350 nm est vraisemblablement impactée par le dépeuplement de l'état fondamental car le maximum d'absorption de K se situe vers 320 nm. Le spectre de $^3V^*$ tracé dans le benzène désoxygéné présente deux maxima, un à 395 nm et l'autre vers 590 nm. Pour les mêmes raisons précédemment évoquées, le maximum à 395 nm n'est sans doute qu'apparent également. Pour les deux molécules, les spectres d'absorption s'étendent sur une très large gamme de longueurs d'onde.

Les spectres d'absorption UV-Visible de $K^{\cdot-}$ et de $V^{\cdot-}$ ne sont pas disponibles dans la littérature. Toutefois Pan et al. affirment que les spectres des radicaux anions de K et V sont forts similaires aux spectres des radicaux cations des molécules respectives⁴. Nous avons donc choisi d'illustrer les spectres de ces derniers qui sont donnés dans la référence 4. Le spectre d'absorption de $K^{\cdot+}$ obtenu par radiolyse pulsée en solution aqueuse aérée contenant 0,1M de t-BuOH et 20 mM de $K_2S_2O_8$ est donné Figure VI.3. Le spectre d'absorption de $V^{\cdot+}$ obtenu par radiolyse pulsée en milieu aéré dans la même solution est donné Figure VI.4. On peut conclure que ces deux molécules ont des spectres d'absorption des espèces fondamentales et radicalaires (cations ou anions) très semblables ce qui complique leur distinction.

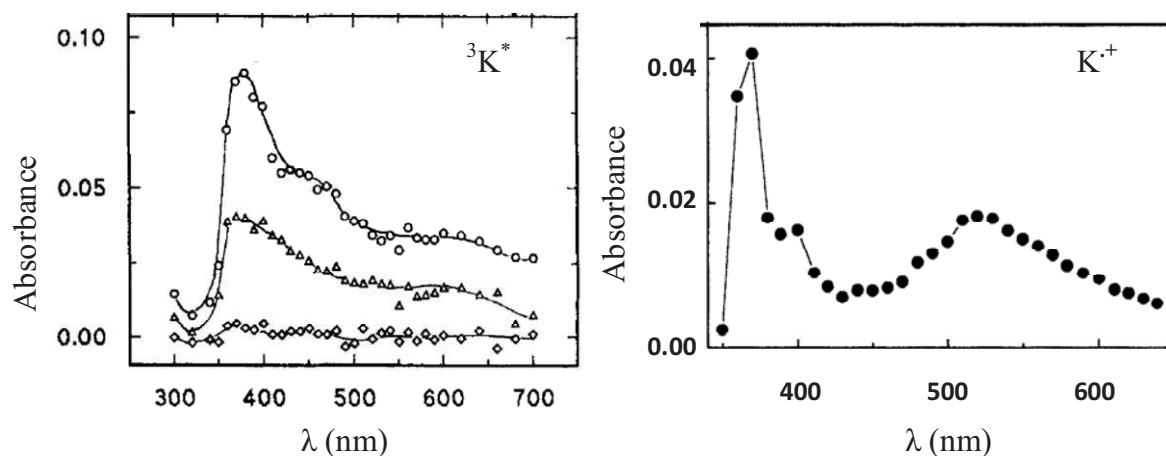


Figure VI.3 : **A gauche**, spectre d'absorption du ${}^3K^*$ en solution désoxygénée dans le benzène, enregistré à 0,1 μ s (O), 1,3 μ s (Δ) et 7,8 μ s (\diamond) après le pulse ($\lambda_{exc} = 347$ nm, $A_{347} = 0,2$) ; issu de la référence 5. **A droite**, spectre d'absorption du K^+ en solution aqueuse aérée contenant 0,1M de t-BuOH et 20 mM de $K_2S_2O_8$ obtenu par radiolyse pulsée (5 μ s après le pulse d'électron) ; issu de la référence 4.

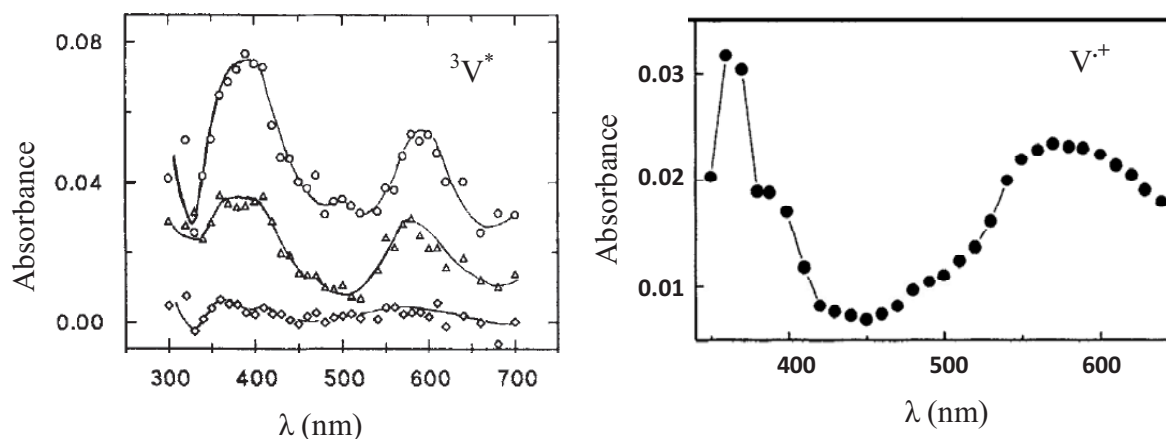


Figure VI.4 : **A gauche**, spectre d'absorption du ${}^3V^*$ en solution désoxygénée dans le benzène, enregistré à 0,16 μ s (O), 1,8 μ s (Δ) et 7,8 μ s (\diamond) après le pulse ($\lambda_{exc} = 347$ nm, $A_{347} = 0,2$) ; issu de la référence 5. **A droite**, spectre d'absorption du V^+ en solution aqueuse aérée contenant 0,1M de t-BuOH et 20 mM de $K_2S_2O_8$ obtenu par radiolyse pulsée (5 μ s après le pulse d'électron) ; issu de la référence 4.

3. Etude des espèces transitoires en solution

Toutes les solutions ont été préparées dans l'acétonitrile. Les spectres d'absorption transitoires ont été obtenus par photolyse laser flash en excitant à 355 nm. Dans un premier temps, nous avons étudié les deux molécules seules en solution puis nous les avons mises en présence de différents quenchers. L'objectif était de mesurer la réactivité des états excités triplets et de mesurer les spectres des formes réduites. Nous avons utilisé comme quenchers :

- le 2-propanol qui est un donneur d'atome H et est capable de réduire les états triplets⁶,
- le DABCO (1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane) qui est un donneur d'électron⁶,
- le NaI qui est capable de produire les radicaux anions⁷,
- la cycloxydime qui va servir dans la suite de ce travail de sonde chimique pour mesurer la production d'oxygène singulet à la surface des films de cire.

3.1 Etude de khellin en solution

3.1.1 Irradiation de K seule

Les spectres ont été mesurés pour des solutions de K préparées dans l'acétonitrile à $1,5 \times 10^{-4}$ M. L'absorbance à 355 nm était de 0,10. Les solutions étaient saturées en air (concentration d'oxygène = $2,4 \times 10^{-3}$ M)⁸ ou désoxygénées à l'argon. Les spectres obtenus en milieu désoxygéné à la fin du pulse et 10 μ s après le pulse sont donnés Figure VI.5.

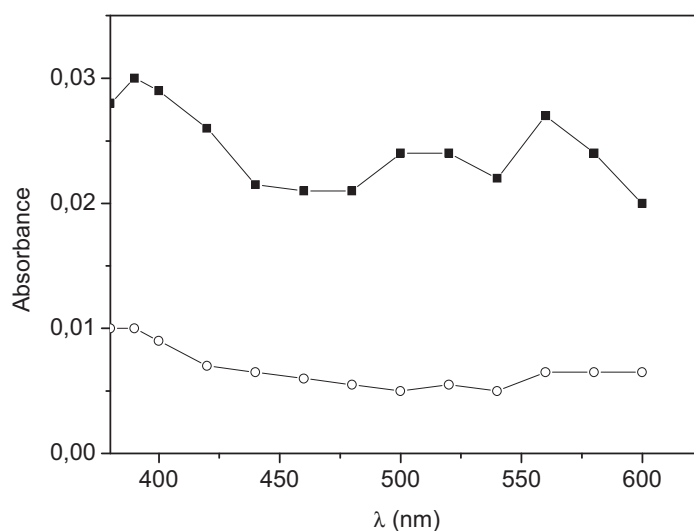


Figure VI.5 : Spectre d'absorption de $^3K^*$ mesuré dans l'acétonitrile en solution désoxygénée à l'argon à la fin du pulse (■) et 10 μ s après le pulse (○) ($\lambda_{exc} = 355$ nm, $A_{355} = 0,1$).

Ce spectre ressemble à celui mesuré dans le benzène avec toutefois une absorption encore assez importante au-delà de 500 nm. La bande est extrêmement large puisque l'absorption commence à 375 nm et s'étend bien au-delà de 600 nm, ceci confirme les données de la littérature⁵. Sur la Figure VI.6 est présentée la décroissance de l'absorbance à 390 nm. La

cinétique de disparition est de pseudo premier ordre et la valeur de la constante de vitesse de pseudo-premier ordre est de $(2,5 \pm 0,4) \times 10^5 \text{ s}^{-1}$. A $10 \mu\text{s}$ après le pulse, il reste une absorption résiduelle de très longue durée de vie. On peut en déduire qu'il se forme une nouvelle espèce. En milieu aéré, le triplet disparaît beaucoup plus vite comme on peut le voir à la Figure VI.6. La constante de pseudo premier ordre est égale à $(1,3 \pm 0,3) \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. Considérant que la concentration en oxygène est de $2,4 \times 10^{-3} \text{ M}$, on en déduit que la somme des constantes de vitesse de quenching (k_q) et de réaction de $^3\text{K}^*$ avec l'oxygène (k_{O_2} et k_1) est de $(5,3 \pm 0,5) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

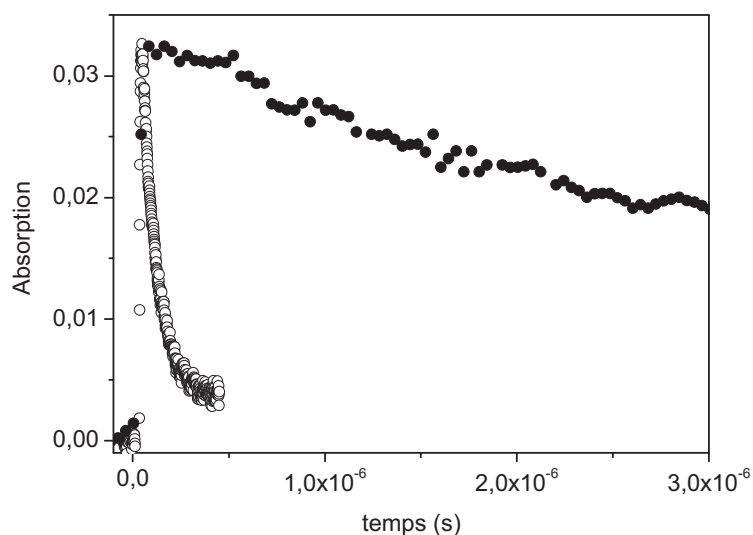


Figure VI.6 : Disparitions de $^3\text{K}^*$ sous air (O) et sous argon (●) suivies à 390 nm.

3.1.2 Irradiation de K en présence de capteurs potentiels

Pour tenter de former le radical anion de K, nous avons irradié K en présence de différents réducteurs: le 2-propanol, le NaI et le DABCO. Ces spectres obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence une quelconque réactivité de K avec ces agents réducteurs.

3.2 Etude du visnagin en solution

3.2.1 Irradiation de V seul

Les spectres ont été mesurés pour des solutions de V préparées dans l'acétonitrile à $6,9 \times 10^{-4} \text{ M}$. L'absorbance à 355 nm était de 0,08. Les solutions étaient saturées en air (concentration d'oxygène = $2,4 \times 10^{-3} \text{ M}$)⁸ ou désoxygénées à l'argon. Les spectres obtenus en milieu désoxygéné à la fin du pulse et $8 \mu\text{s}$ après le pulse sont donnés Figure VI.10.

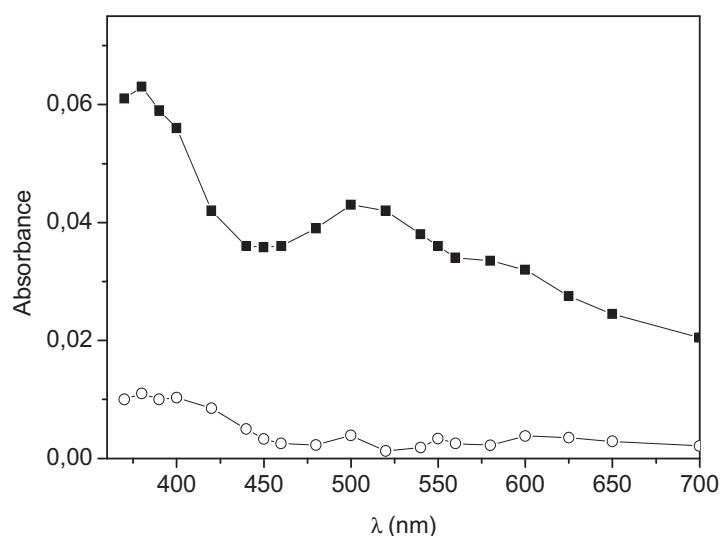


Figure VI.10 : Spectre d'absorption de $^3V^*$ dans l'acétonitrile desoxygéné, mesuré à la fin du pulse (■) et 8 μ s après le pulse (◇).

Le spectre à la fin du pulse ressemble à celui mesuré avec K. La bande est large et un maximum se dessine vers 380 nm. Un deuxième maximum est visible vers 500 nm contre 600 nm dans le benzène. La Figure VI.11 montre les déclin d'absorbance sous argon et en milieu saturé d'air. En milieu desoxygéné, la disparition suit une cinétique de pseudo premier ordre et la valeur de la constante de vitesse est de $(5,5 \pm 0,8) \times 10^5 \text{ s}^{-1}$. En milieu aéré, le triplet disparaît beaucoup plus vite. La constante de pseudo premier ordre est égale à $(1,1 \pm 0,4) \times 10^7 \text{ s}^{-1}$. Considérant que la concentration en oxygène est de $2,4 \times 10^{-3} \text{ M}$, on en déduit que la somme des constantes de vitesse de quenching (k_q) et de réaction de $^3V^*$ avec l'oxygène (k_{O_2} et k_1) est de $(4,4 \pm 0,6) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

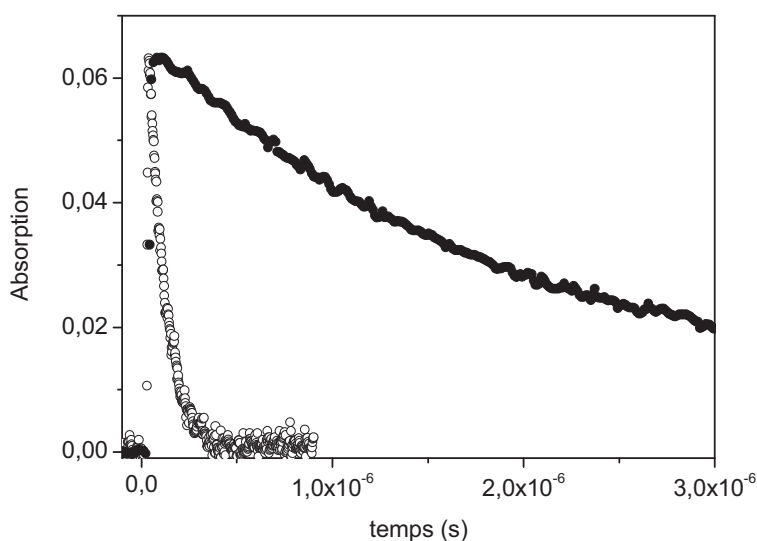


Figure VI.11 : Disparition de $^3V^*$ sous air (O) et sous argon (●) suivie à 390 nm.

3.2.2 Irradiation de V en présence de capteurs potentiels

Les expériences de photolyse ont été réalisées sur des solutions d'acétonitrile contenant V seul, V et 2×10^{-3} M de DABCO, V et 2×10^{-3} M de NaI désoxygénées sous argon. La concentration de V était de $6,9 \times 10^{-4}$ M dans ces trois solutions. A la fin du pulse, nous avons obtenu les mêmes spectres d'absorption transitoires pour les trois solutions correspondant donc au spectre de $^3V^*$. Nous présentons donc Figure VI.12 uniquement les spectres d'absorption transitoires mesurés 8 μ s après le pulse.

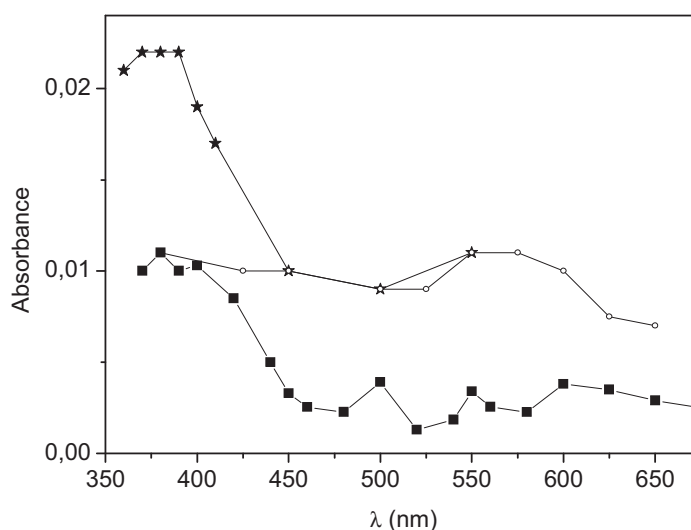
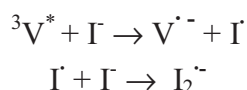


Figure VI.12 : Spectres d'absorption transitoires mesurés 8 μ s après le pulse pour une solution de V dans l'acétonitrile pur (■), en présence de 2×10^{-3} M de DABCO (○) et de 2×10^{-3} M de NaI (★).

La comparaison des trois spectres mesurés 8 μ s après le pulse montre que l'ajout de DABCO et de NaI a induit des réactions supplémentaires :

- Les absorbances mesurées entre 370 et 450 nm dans la solution V+NaI sont nettement supérieures à celles mesurées dans la solution de V seul. Or nous avons vérifié que l'irradiation d'une solution de NaI à 2×10^{-3} M dans l'acétonitrile à la même absorbance ($A_{355\text{nm}} = 0,009$) ne donne pas lieu à $I_2^{\cdot-}$.
- Les absorbances mesurées entre 370 et 420 nm dans la solution V+DABCO sont identiques à celles mesurées dans la solution de V seul.
- Entre 450 et 650 nm, les absorbances mesurées pour les solutions contenant soit V+DABCO soit V+NaI sont deux fois supérieures à celles mesurées dans la solution de V seul.

L'absorption avec maximum à 380 nm observée dans la solution contenant V+NaI 8 μ s après le pulse rappelle celle de l'espèce radicalaire $I_2^{\cdot-}$ ⁽⁹⁾. Ces radicaux $I_2^{\cdot-}$ seraient donc formés par oxydation de I^- en $I^{\cdot-}$ suivi d'une addition de $I^{\cdot-}$ sur I^- selon :



Le fait que les absorbances mesurées à 500 nm disparaissent apparemment moins vite pour les solutions V+DABCO et V+NaI que pour V seul est une autre confirmation qu'il y a bien eu réaction (voir Figure VI.13).

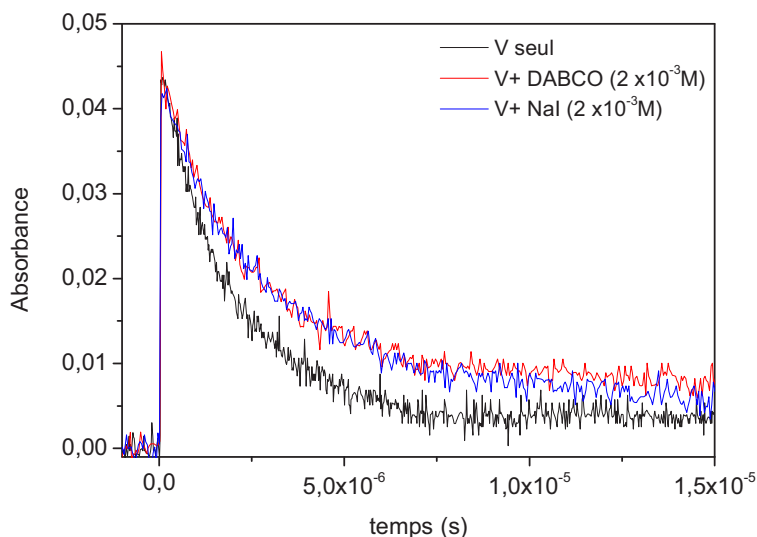


Figure VI.13 : Déclin d'absorbance mesurée à 500 nm.

On peut donc conclure que $^3V^*$ est réduit par le DABCO et NaI avec formation de V^- . Ce résultat est en accord avec le spectre présenté Figure VI.12 : entre 450 et 650nm, les transitoires formés dans les solutions V+DABCO et V+NaI absorbent plus que ceux de la solution V seul. Dans cette région spectrale, cette différence est uniquement attribuée à la formation de V^- . A 380 nm, les traces dans les solutions de V pur et V+DABCO sont superposables, par conséquent, V^- et $^3V^*$ absorbent de façon similaire dans cette région spectrale (voir Figure VI.12 et VI.14).

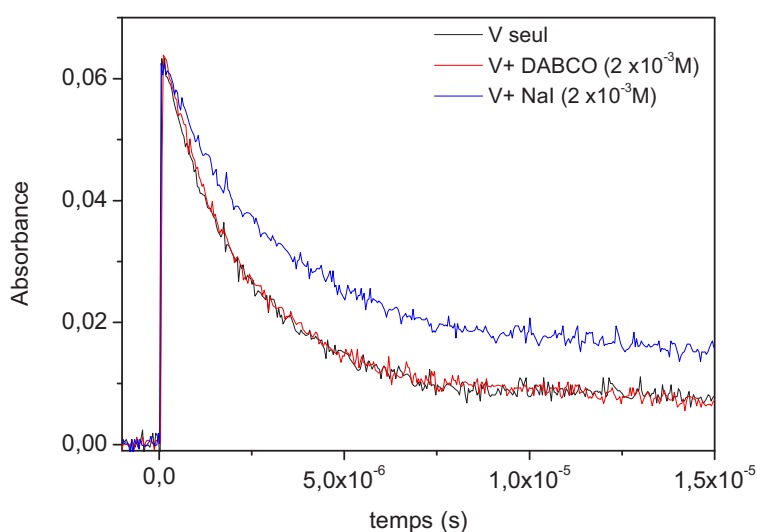


Figure VI.14 : Déclin d'absorbance mesurée à 380 nm.

La décroissance mesurée à 380 nm doit être la superposition de la décroissance de l'absorption de $^3V^*$, de la formation puis de la disparition de $V^{\cdot-}$ et de la formation puis de la disparition de $I_2^{\cdot-}$. Si $^3V^*$ et $V^{\cdot-}$ absorbent pareillement, la disparition de l'un est compensée par la formation de l'autre. On peut alors suivre par soustraction l'absorbance de $I_2^{\cdot-}$ (Figure VI.15).

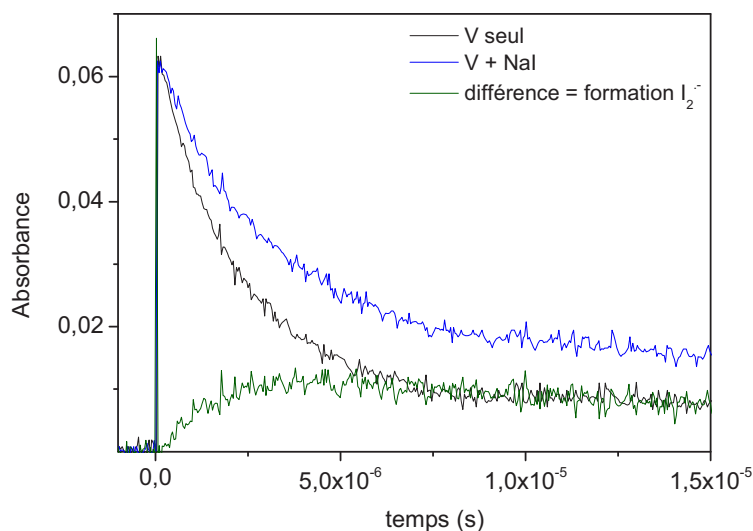


Figure VI.15 : Formation de l'espèce $I_2^{\cdot-}$ suivie à 380 nm obtenue par soustraction de spectres.

En se basant sur cette courbe, on peut évaluer à $3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ la constante de vitesse de pseudo premier ordre de formation de $I_2^{\cdot-}$. En supposant que l'addition de $I^{\cdot-}$ sur $I^{\cdot-}$ est limitée par la diffusion, il viendrait que la constante de vitesse de réaction de $^3V^*$ avec $I^{\cdot-}$ se situerait autour de $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

En conclusion, en utilisant NaI nous avons pu prouver qu'il y a avait oxydation des iodures et donc réduction de $^3V^*$. Cependant, le spectre de $V^{\cdot-}$ n'a pu être tracé. Nous pouvons toutefois conclure que ce radical absorbe dans le même domaine de longueur d'onde que $^3V^*$ et avec des coefficients d'absorption très semblables autour de 400 nm. Avec la khellin, la photoréduction n'a pas pu être mise en évidence.

4. Photoréactivité en solution de la cycloxydime en présence de visnagin

Dans cette partie nous avons étudié la phototransformation de CD en présence de V en solution. Celle-ci peut impliquer l'oxygène singulet puisque CD réagit avec, comme nous l'avons démontré au chapitre IV. Comme par ailleurs, nous venons aussi de démontrer au point précédent que V peut subir une réduction lorsqu'il est irradié en présence d'agents réducteurs, on peut imaginer qu'une telle réaction avec CD n'est pas exclue. Pour déterminer le mécanisme détaillé de réaction, nous avons entrepris une étude par irradiation continue et photolyse nanoseconde.

4.1 Etude en irradiations continues

Toutes les solutions ont été préparées dans l'acétonitrile. La concentration de V dans les mélanges a été fixée à 10^{-4} M tandis que la concentration de CD était comprise entre 2×10^{-5} et 10^{-4} M. Les solutions ont été irradiées à 334 nm soit en milieu aéré soit en milieu désoxygéné puis analysées par HPLC-DAD. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau IV.2. Les vitesses rapportées sont des vitesses initiales, c'est-à-dire mesurées à un taux de conversion autour de 10 et 20 %. En milieu désoxygéné, la vitesse de phototransformation de CD seule est de $(1,9 \pm 0,3) \times 10^{-9} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Cela correspond à un rendement quantique de disparition de CD égal à $1,7 \times 10^{-2}$ comme indiqué dans le chapitre V. En présence de V, cette vitesse est nettement accélérée ce qui montre qu'il y a bien sensibilisation. La vitesse augmente quand la concentration en CD augmente.

En milieu aéré, CD se phototransforme environ deux fois plus vite que sous argon ($\Phi = 3,9 \times 10^{-2}$) et V sensibilise aussi la réaction. On remarque que les vitesses de disparition de CD en présence de V sont plus faibles sous air que sous argon alors même que la photolyse directe est plus importante. Cela montre que CD disparaît par réaction avec le triplet de V de façon significative en milieu désoxygéné. En présence d'oxygène, l'importance de cette réaction est nettement réduite et la voie impliquant l'oxygène singulet ne compense pas cette diminution.

Tableau VI.2 : Absorbance (A) des molécules et vitesses de phototransformation de CD (ν_{CD}) irradiée en présence de V à 334 nm dans l'acétonitrile.

condition	[CD] (M)	[V] (M)	A_{CD}	A_{V}	$\nu_{\text{CD}} (\text{M s}^{-1})$
solution desoxygénée	1×10^{-4}	0	0,065	-	$(0,19 \pm 0,03) \times 10^{-8}$
	1×10^{-4}	10^{-4}	0,065	0,29	$(3,1 \pm 0,5) \times 10^{-8}$
	5×10^{-5}	10^{-4}	0,032	0,29	$(2,2 \pm 0,3) \times 10^{-8}$
	2×10^{-5}	10^{-4}	0,013	0,29	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^{-8}$
solution aérée	1×10^{-4}	0	0,065	-	$(0,42 \pm 0,06) \times 10^{-8}$
	1×10^{-4}	10^{-4}	0,065	0,29	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^{-8}$
	5×10^{-5}	10^{-4}	0,032	0,29	$(0,72 \pm 0,1) \times 10^{-8}$
	2×10^{-5}	10^{-4}	0,013	0,29	$(0,26 \pm 0,4) \times 10^{-8}$

4.2 Etude par photolyse laser flash : réactivité de $^3\text{V}^*$ avec CD

Par photolyse laser flash, nous avons pu suivre la réactivité de $^3\text{V}^*$ avec CD en milieu désoxygéné. Les concentrations de CD ont été choisies entre 5×10^{-4} à 2×10^{-3} M. La longueur d'onde d'excitation laser était de 355 nm et l'absorbance de V était de 0,09 à cette longueur d'onde. La variation d'absorbance de la solution a été suivie à 390 et 500 nm. La Figure VI.16 montre que CD exerce un effet accélérateur sur la disparition de $^3\text{V}^*$.

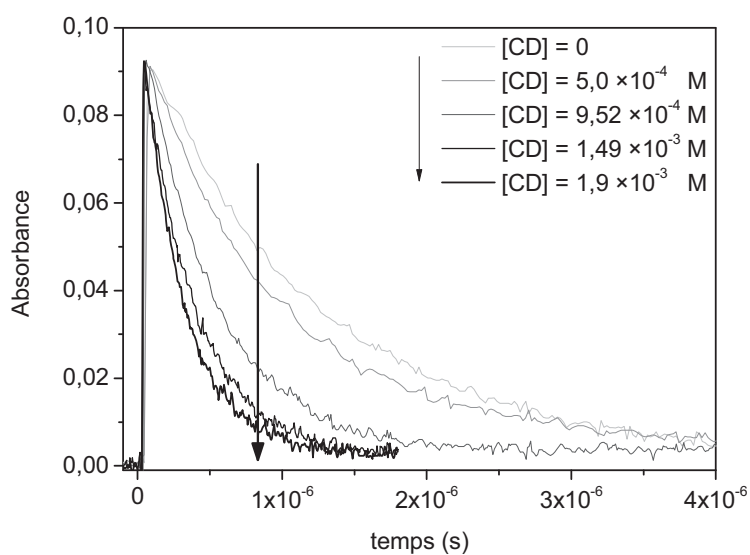


Figure VI.16 : Influence de CD sur la variation au cours du temps de l'absorbance mesurée à 390 nm en milieu désoxygéné.

Nous avons porté la constante de vitesse de premier ordre apparente (k_{app}) en fonction de $[CD]$ (Figure VI.17). La variation bien linéaire montre que l'on peut écrire :

$$k_{app} = k_d + k[CD]$$

où k_d est la constante de vitesse de désactivation de $^3V^*$ par le solvant et k , la constante de vitesse de réaction apparente entre $^3V^*$ et CD. L'ordonnée à l'origine de cette droite est k_d et la pente est k dont la valeur est de $(1,4 \pm 0,3) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

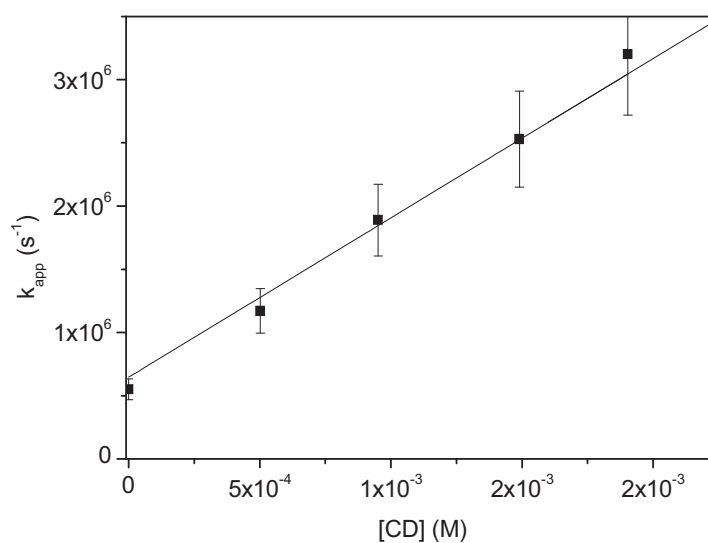
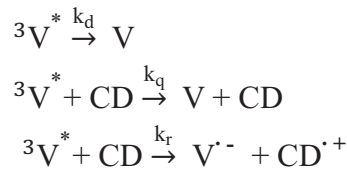


Figure VI.17 : Réaction de $^3V^*$ avec CD en milieu désoxygéné.

Deux voies de réaction avec CD sont possibles : la désactivation et la réaction chimique avec formation du radical anion $V^{\cdot-}$:



Nous appellerons k_q le terme de désactivation par CD et k_r le terme de réaction chimique. Par ailleurs, nous avons vu au paragraphe précédent que le triplet et le radical anion absorbent dans la même zone de longueurs d'onde. Par conséquent, les phénomènes sont plus complexes à interpréter.

La vitesse de disparition de ${}^3V^*$ est égale à : $v_{3V^*} = k_d[{}^3V^*] + (k_q + k_r)[{}^3V^*][CD]$

et la vitesse de formation de $V^{\cdot-}$ est égale à : $v_{V^{\cdot-}} = k_r[{}^3V^*][CD]$

Si l'on suivait la diminution d'absorbance à une longueur d'onde où seul ${}^3V^*$ absorbait, alors on aurait directement accès à $k_d + (k_r + k_q)[CD]$. Dans notre cas particulier, $V^{\cdot-}$ absorbe aussi, la décroissance d'absorbance que l'on mesure est donc la superposition de deux phénomènes : la disparition de ${}^3V^*$ et la formation de $V^{\cdot-}$. La vitesse apparente de disparition de ${}^3V^*$ est inférieure à la « vraie » vitesse. A partir de cette vitesse apparente, on peut recalculer la vraie vitesse à la condition de connaître les coefficients d'absorption des deux espèces. Dans notre cas particulier, on a déduit des résultats du § précédent que ${}^3V^*$ et $V^{\cdot-}$ absorbent de façon quasi similaire vers 390 nm. Par conséquent, on peut faire l'hypothèse que la vitesse mesurée est égale à $v_{3V^*} - v_{V^{\cdot-}} = [{}^3V^*](k_d + (k_q + k_r)[CD]) - k_r[{}^3V^*][CD] = (k_d + k_q[CD])[{}^3V^*]$

La pente mesurée correspond donc à k_q qui vaut $(1,4 \pm 0,3) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

4.3 Interprétation des résultats

Lorsque CD est irradié en milieu désoxygéné en présence de V, il disparaît par phototransformation directe et par phototransformation sensibilisée :

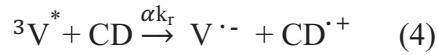
$$v_{CD} = (v_{CD})_d + (v_{CD})_s^V$$

avec $(v_{CD})_d$ la vitesse de disparition de CD par photolyse directe et $(v_{CD})_s^V$ la vitesse de disparition de CD sensibilisée par V. L'équation décrivant la vitesse de disparition par photolyse directe s'écrit :

$$(v_{CD})_d = I_a^{CD} \cdot \Phi^{CD}$$

avec I_a^{CD} le flux de photons absorbés par CD dans la solution mélange et Φ^{CD} le rendement quantique de photodégradation de CD à 334 nm.

En milieu désoxygéné, la disparition de CD par sensibilisation peut être décrite par les processus donnés dans le schéma VI.1.



$$k_1 + k_2 = k_d$$

Schéma VI.1 : Réactivité de $^3V^*$ en présence de CD en milieu désoxygéné.

Le triplet $^3V^*$ peut se désactiver et redonner V (processus 1, k_1). L'étude en photolyse flash ayant montré que sous argon, l'absorbance à 390 nm ne revenait pas tout à fait à zéro, il se pourrait que $^3V^*$ réagisse aussi selon d'autres voies, avec le solvant ou peut-être lui-même pour donner par exemple des radicaux (processus 2, k_2). Dans la suite nous ne considérerons que k_d , somme de k_1 et de k_2 . $^3V^*$ réagit avec CD selon deux processus : une désactivation (processus 3, k_q) et une réaction d'oxydo-réduction (processus 4, k_r). CD disparaît par le processus 4. Nous considérerons que α est la fraction de radicaux qui sortent de la cage de solvation après le transfert d'électron. La fraction $(1 - \alpha)$ correspond à celle redonnant V et CD. La vitesse de disparition sensibilisée de CD, $(v_{CD})_s^V$, est donc égale à $\alpha k_r [^3V^*][CD]$.

Dans toutes les équations, nous considérons les vitesses initiales et les concentrations initiales des réactifs. Pour déterminer la concentration en $^3V^*$, on fait l'hypothèse de l'état quasi-stationnaire c'est-à-dire que l'on suppose que la vitesse de formation de $^3V^*$ est égale à sa vitesse de disparition. Nous pouvons donc écrire :

$$I_a^V \cdot \Phi_T = k_d [^3V^*] + (k_r + k_q) [^3V^*][CD]$$

où I_a^V est le flux de photons absorbés par V dans la solution mélange et Φ_T est le rendement quantique de formation du triplet de V. La concentration quasi-stationnaire de $^3V^*$ s'écrit :

$$[^3V^*] = \frac{I_a^V \cdot \Phi_T}{k_d + (k_r + k_q)[CD]}$$

et la vitesse de disparition sensibilisée de CD sous argon:

$$(v_{CD})_s^V = \alpha k_r [CD][^3V^*] = \frac{\alpha I_a^V \cdot \Phi_T \cdot k_r [CD]}{k_d + (k_r + k_q)[CD]}$$

En milieu aéré, il faut ajouter les voies de réaction de l'oxygène avec les espèces en solution ainsi que la désactivation de l'oxygène singulet.

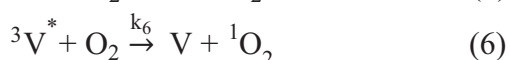
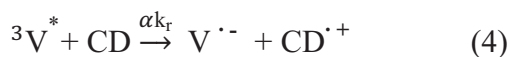


Schéma VI.2 : Réactivité de $^3V^*$ en présence de CD en milieu désoxygéné.

Les processus 1 à 4 ont été décrits précédemment. $^3V^*$ se fait désactiver par O_2 (processus 5, k_5) ou réagit avec l'oxygène à l'état fondamental par transfert d'énergie pour former 1O_2 (processus 6, k_6). La désactivation de $^3V^*$ par O_2 est prouvée par le fait que le Φ_T est égal à 0,86 alors que le Φ_Δ est égal à 0,41 dans le dioxane⁵. Nous avons mesuré ce dernier dans l'acétonitrile (voir § 5.1 de ce chapitre).

$$\Phi_\Delta = \Phi_T \cdot \frac{k_6 [O_2]}{(k_d + k_5 [O_2] + k_6 [O_2])}$$

L'espèce V^\cdot peut réagir avec l'oxygène pour former O_2^\cdot (processus 7, k_7). Afin de simplifier le mécanisme, l'oxydation de CD par O_2^\cdot n'a pas été prise en compte. CD peut désactiver 1O_2 (processus 8, k_8) ou réagir avec pour former CDO_2 (processus 9, k_9). L'oxygène singulet peut encore être désactivé par le solvant (processus 10, k_{10}) ou par V (processus 11, k_{11}). Sachant que le rapport k_{10}/k_9 est égal à $3,3 \times 10^{-3}$ M (voir article Chemosphere au chapitre V) et que $k_{10} = (1,7 \pm 0,4) \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ (¹⁰), k_9 vaut $(5,2 \pm 0,5) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Nous négligerons dans la suite le processus 8 devant le processus 9. Le processus 11 a également été négligé afin de simplifier la résolution des équations. En milieu aéré, CD disparaît par 3 voies différentes : par photolyse directe, par réaction avec $^3V^*$ et par réaction avec l'oxygène singulet.

$$v_{CD} = (v_{CD})_d + (v_{CD})_s^V + (v_{CD})_s^\Delta$$

$$v_{CD} = I_a^{CD} \cdot \Phi^{CD} + \alpha k_r [^3V^*][CD] + k_9 [^1O_2][CD]$$

La concentration quasi-stationnaire de $^3V^*$ s'obtient en écrivant la relation:

$$I_a^V \cdot \Phi_T = k_d [^3V^*] + (\alpha k_r + k_q) [^3V^*][CD] + (k_5 + k_6) [^3V^*][O_2]$$

Il vient:

$$[^3V^*] = \frac{I_a^V \cdot \Phi_T}{k_d + (\alpha k_r + k_q)[CD] + (k_5 + k_6)[O_2]}$$

De même, la concentration de 1O_2 quasi-stationnaire s'obtient à partir de la relation:

$$k_6 [^3V^*][O_2] = k_9 [CD][^1O_2] + k_{10} [^1O_2]$$

Il vient:

$$[^1O_2] = \frac{k_6 [^3V^*][O_2]}{(k_9 [CD] + k_{10})}$$

La vitesse de réaction de CD avec $^3V^*$ en solution aérée, $(v_{CD})_s^V$, s'écrit :

$$(v_{CD})_s^V = \alpha k_r [CD] [^3V^*] = \frac{I_a^V \cdot \Phi_T \cdot \alpha k_r [CD]}{k_d + (\alpha k_r + k_q) [CD] + (k_5 + k_6) [O_2]}$$

et la vitesse de réaction de CD avec 1O_2 , $(v_{CD})_s^\Delta$, s'écrit :

$$(v_{CD})_s^\Delta = k_9 [CD] [^1O_2] = \frac{k_9 [CD] k_6 [^3V^*] [O_2]}{(k_9 [CD] + k_{10})}$$

$$(v_{CD})_s^\Delta = \frac{k_9 [CD] k_6 [O_2]}{(k_9 [CD] + k_{10})} \cdot \frac{I_a^V \cdot \Phi_T}{k_d + (\alpha k_r + k_q) [CD] + (k_5 + k_6) [O_2]}$$

Pour calculer chacun de ces termes, nous disposons des données suivantes :

la valeur de I_a^V est de $3,65 \times 10^{-7}$ Einstein $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$. La valeur de k_d est de $(5,5 \pm 0,8) \times 10^5 \text{s}^{-1}$. La valeur de Φ_T est donnée dans la littérature⁵ et vaut 0,86 dans le cyclohexane, 0,83 dans le dioxane et chute en présence d'eau dans la solution. Nous avons choisi Φ_T égal à 0,86 dans l'acétonitrile. Nous avons aussi mesuré Φ_Δ (voir article soumis au § 5 de ce chapitre) et nous avons trouvé $(0,24 \pm 0,05)$.

La constante de vitesse globale disparition de $^3V^*$ en milieu aéré est égale à $k_d + (k_5 + k_6) [O_2]$ et vaut $(1,1 \pm 0,4) \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. Connaissant la valeur de la concentration en oxygène dans l'acétonitrile $(2,4 \times 10^{-3} \text{M})$ ⁸, on trouve que la somme $k_5 + k_6$ est égale à $(4,4 \pm 0,6) \times 10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. La valeur de la constante k_6 peut être déterminée grâce à l'équation décrivant Φ_Δ :

$$\Phi_\Delta = \Phi_T \cdot \frac{k_6 [O_2]}{(k_d + (k_5 + k_6) [O_2])}$$

On trouve ainsi k_6 égal à $(1,4 \pm 0,3) \times 10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. Le rapport k_{10}/k_9 a été calculé dans l'article « chemosphere » (chapitre V) et vaut $3,3 \times 10^{-3} \text{M}^{-1}$. La valeur de k_{10} est donnée dans la littérature¹⁰ et vaut $(1,7 \pm 0,4) \times 10^4 \text{s}^{-1}$. Par conséquent, k_9 vaut $(5,2 \pm 0,5) \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$.

Dans l'article « Reactivity of cycloxydim toward singlet oxygen in solution and on wax film », nous avons pris la valeur de $k_{10} = (3,3 \pm 0,7) \times 10^4 \text{s}^{-1}$ qui est donnée par Merkel¹¹. Ce choix a donc affecté la valeur de k_9 dans cet article. Enfin, nous avons mesuré au § 4.2 la valeur de k_q qui vaut $(1,4 \pm 0,3) \times 10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. Les seules inconnues sont donc k_r et le coefficient α . Nous avons porté dans le tableau VI.2 les vitesses expérimentales et calculées en prenant $k_r = 1 \times 10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ et $\alpha = 0,7$.

Tableau VI.2 : Vitesses de phototransformation de CD directes et sensibilisées, mesurées et calculées. Irradiation en présence de V (fixé à 10^{-4} M) à 334 nm. Les vitesses sont exprimées en $M^{-1} s^{-1}$.

dans l'acétonitrile désoxygéné						
[CD] (M)	A_{CD}	v_{CD} mesurée	$(v_{CD})_d$	$(v_{CD})_s^V$	$(v_{CD})_s^\Delta$	v_{CD} totale calculée
10^{-4}	0,065	$3,1 \times 10^{-8}$	$1,9 \times 10^{-9}$	$2,8 \times 10^{-8}$	-	$3,0 \times 10^{-8}$
5×10^{-5}	0,032	$2,2 \times 10^{-8}$	$0,93 \times 10^{-9}$	$1,6 \times 10^{-8}$	-	$1,7 \times 10^{-8}$
2×10^{-5}	0,013	$1,4 \times 10^{-8}$	$0,38 \times 10^{-9}$	$0,7 \times 10^{-8}$	-	$0,8 \times 10^{-8}$

dans l'acétonitrile saturé en air						
[CD] (M)	A_{CD}	v_{CD} mesurée	$(v_{CD})_d$	$(v_{CD})_s^V$	$(v_{CD})_s^\Delta$	v_{CD} totale calculée
10^{-4}	0,065	$1,3 \times 10^{-8}$	$4,2 \times 10^{-9}$	$2,9 \times 10^{-9}$	$2,5 \times 10^{-9}$	$0,96 \times 10^{-8}$
5×10^{-5}	0,032	$7,2 \times 10^{-9}$	$2,1 \times 10^{-9}$	$1,45 \times 10^{-9}$	$1,3 \times 10^{-9}$	$0,49 \times 10^{-8}$
2×10^{-5}	0,013	$2,6 \times 10^{-9}$	$0,84 \times 10^{-9}$	$0,58 \times 10^{-9}$	$0,5 \times 10^{-9}$	$0,19 \times 10^{-8}$

Les vitesses calculées en prenant k_r égal à $10^9 M^{-1} s^{-1}$ et α égal à 0,7 sont assez satisfaisantes dans la mesure où elles donnent l'ordre de grandeur des vitesses mesurées. Le calcul des vitesses individuelles montre les choses suivantes :

- en milieu désoxygéné, la photolyse directe de CD ne représente que 5% de la disparition. L'essentiel de la phototransformation est due à l'oxydation de CD par le triplet de V.
- en milieu aéré, la photolyse directe compte pour près de 50 % de la disparition. L'oxydation par le triplet et par l'oxygène singulet sont du même ordre de grandeur.

5. Photoréactivité en phase solide de la Cycloxydime en présence de Visnagin et de Khellin inclus dans la cire

Cette section est consacrée à la mesure des rendements quantiques de production d'oxygène singulet (Φ_Δ) de K et V dans un environnement le plus proche possible des constituants foliaires.

Les phytoalexines sont synthétisées dans les cellules épidermales des plantes. Nicholson et al. ont pu les localiser grâce à une variété de plantes produisant des phytoalexines colorées¹². Ces composés s'accumulent dans des inclusions des cellules épidermales et peuvent libérer leur contenu hors de celles-ci en présence du pathogène. Parce que les membranes cellulaires et la cuticule des plantes sont composées de constituants lipidiques, nous avons souhaité mesurer les Φ_Δ des phytoalexines K et V dans des environnements proches des constituants cuticulaires. Pour ce faire, l'heptane et la cire de paraffine ont été choisis. Bien qu'il existe de

nombreuses données dans la littérature sur les Φ_{Δ} de composés naturels dont l'une des plus complètes est un article revue listant les Φ_{Δ} dans divers solvants organiques², très peu ont été mesurés dans des alcanes. De plus, il n'existe à notre connaissance aucune mesure de Φ_{Δ} de phytoalexines qui aient été réalisées dans un support solide. Pourtant K et V sont des composés dont les propriétés physico-chimiques sont fortement dépendantes du milieu qui les entoure. L'article inclus ci-après détaille la mesure des Φ_{Δ} de K et V dans l'acétonitrile, l'heptane et la cire de paraffine en utilisant une sonde chimique réactive à l'oxygène singulet, le 1,3-diphénylisobenzofurane.

5.1 Singlet oxygen production by phytoalexins in wax films – Article soumis

S. Monadjemi, A. Trivella, A. ter Halle, C. Richard

Shirin Monadjemi¹, Aurélien Trivella¹, Alexandra ter Halle^{1,2}, Claire Richard^{1,2*}

¹ Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND

² CNRS, UMR 6296, ICCF, F-63171 AUBIERE

Abstract:

Under sunlight irradiation, leaves of phototoxic plants produce singlet oxygen. This singlet oxygen production is due to the presence of sensitizing secondary metabolites synthesized by plants under different forms of stress. The present work was devoted to the two phytoalexins: khellin and visnagin. The ability of these molecules to generate singlet oxygen was studied in solution (heptane and acetonitrile) and in paraffinic wax to mimic the leaves surface. Phenalenone was used as a reference sensitizer and 1,3-diphenylisobenzofuran as singlet oxygen probe. For khellin, the quantum yield of singlet oxygen production in air-saturated medium (Φ_{Δ}) was little, higher in heptane than in acetonitrile (0.30 ± 0.05) against (0.19 ± 0.02) while for visnagin it was identical in both solvents (0.23 ± 0.03). Singlet oxygen production was also detected in wax films by monitoring the decay of the probe by fluorescence. The singlet oxygen production was 3.5 and 6.1 lower for khellin and visnagin, respectively, than for phenalenone, in accordance with data obtained in the liquid alkane.

Keywords: phytoalexin, khellin, visnagin, singlet oxygen, wax film

Plants are able to defend themselves from pathogen infections or mechanical injury by synthesizing secondary metabolites showing antimicrobial and antifungal activity. These are called phytoalexins when plants synthesize them in response to several forms of stress. Some of these metabolites are capable of absorbing sunlight energy and producing reactive oxygen species (ROS) such as singlet oxygen, superoxide radical and hydrogen peroxide that are toxic to living organisms^{1,2}. Berenbaum and Larsen were the first to show that illuminated leaves of phototoxic plants can produce singlet oxygen detectable up to 1-2 mm above the leaf surface³. These reactive species might also degrade the pesticides freshly deposited on crops. Indeed, after they have been sprayed, pesticides remain on the leaves surface for a time until they reach the biological target. On the leaves, they are exposed to solar light and may undergo photolysis⁴. To understand the fate of pesticides in the field, it is therefore necessary to get a better insight into the photochemical processes occurring on the plant surface or in the cuticle and to evaluate the potential production of ROS. Berenbaum and Larsen measured the singlet oxygen production at the surface of leaves³. Here our objective was to measure the production of singlet oxygen from secondary metabolites inside wax films. This paper is devoted to two phytoalexins belonging to the furanocoumarins (psoralens) groups, khellin (K) and visnagin (V) (structures in Figure 1).

The leaf is a complex medium covered with a thin layer of waxy membrane, which provides an extensive surface for exposure to the sunlight⁵. Cuticles are composed of cutin and integrated and superimposed lipids called “waxes”. Cutin is a rigid three-dimensional network consisting of long-chain fatty acids that are attached to each other by ester linkages¹ while the outer surface of the cuticle is covered with epicuticular waxes. These waxes which consists of complex mixtures of aliphatic hydrocarbons can take diverse forms, from amorphous to crystalline deposits^{1,5,6}. The most common components of waxes are straight-chain alkanes and alcohols of 25 to 35 carbons. Thus we used paraffinic wax films which are a mixture of alkanes with 20 to 40 carbon atoms, to mimic cuticle. These waxes show permeability to oxygen⁷.

The production of singlet oxygen by a sensitizer is expressed in quantum yields (Φ_{Δ}). A full review of singlet oxygen quantum yields from phytoalexins and other biological relevant molecule in solvents is reported by Redmond et al⁸. For some phytoalexins such as khellin and visnagin, Φ_{Δ} is highly dependent on the nature of the medium (see table1). The aim of this study was to measure the ability of khellin and visnagin to produce singlet oxygen in

heptane and in paraffin wax. Phenalenone was used as a reference sensitizer as its Φ_{Δ} is close to unity in most solvents⁹⁻¹¹ and 1,3-diphenylisobenzofuran as singlet oxygen probe¹².

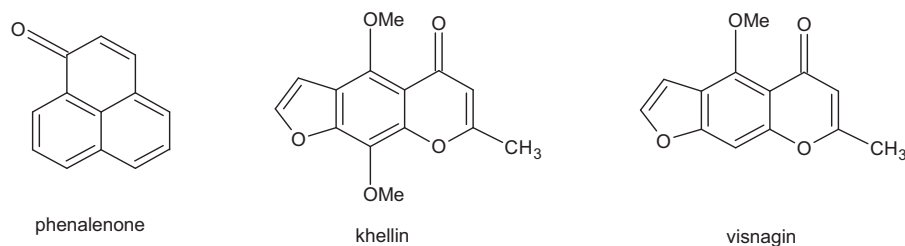


Figure 1: Chemical structures of phenalenone, khellin and visnagin.

Table 1. Quantum yield of singlet oxygen production (Φ_{Δ}) of K and V in various solvents⁸.

solvent	Φ_{Δ}	
	K	V
benzene	0.2	0.1
cyclohexane	0.53	0.41
dioxane	0.52	0.26
D ₂ O	< 0.03	< 0.03

Chemicals and standards. All reagents were used without further purification. 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF, 97%), phenalenone (P, 97% ; mp 153-156°C) , visnagin (V, 97% ; mp 139-142°C), potassium bromide ($\geq 99\%$), paraffin oil (spectroscopic grade), and paraffin wax (mp 70-80°C) were all purchased from Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Khellin for microscopy grade (K, 98% ; mp 150-154°C) was obtained from Fluka. Acetonitrile (HPLC grade) and heptane spectrophotometric-grade (99%) were purchased from Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Water was purified using a Millipore Milli-Q system (Millipore α Q, resistivity 18 M Ω .cm, DOC < 0.1 mg L⁻¹).

Samples preparation. For experiments in solution (heptane or acetonitrile), the probe DPBF was used in the range of 10^{-6} - 10^{-5} M, while the photosensitizer P at a concentration of 5×10^{-6} M, and K and V at 5×10^{-5} M. Stock solutions were prepared for all the compounds. For experiments in wax paraffinic films, we proceeded as follows. Concentrated mixtures of wax+sensitizer, wax+DPBF and wax+sensitizer+DPBF were firstly prepared. For that, chosen

concentrations of additives (3.9×10^{-3} M for P, 1.3×10^{-3} M for DPBF, 8.4×10^{-3} M for V and 7.5×10^{-3} M for K) were obtained by weighting the required amount of additives and wax using the density of paraffin wax¹³ (0.9 g/cm^3). The mixture was heated up to 100°C for homogenization and then allowed to cool down. The thermal stability of additives was previously checked by ATR spectroscopy. Paraffin–DPBF mixtures with concentration varying from 1.45×10^{-5} to 3×10^{-6} M were prepared by diluting the required amount of stock mixture in pure paraffin. The same method was used for all the other diluted mixtures. All sensitizers were prepared at 10^{-4} M. To make paraffin films, about 1 ml of melted wax was poured in 49 cm^2 dishes covered with an aluminium foil. Once the film was cooled down, it was delicately detached from the aluminum foil and set on a microscope slide. Bar coating and spin coating techniques were unsuccessful for film preparation due to the wax viscosity and its rapid solidification. The average thickness of films (0.011 cm) was measured for thirty wax fragments using a digital micrometer (M120 Cadar). After having made, all the films were rinsed with water, but no sensitizer molecules were released in the solution. Pellets of KBr containing P were prepared by weighing the appropriate quantities of KBr and P, an intermediary dilution was necessary. The amount of P-KBr mixture put in the press machine was set at 30 mg in all cases to reach the same thickness for all pellets. The thickness of the pellets was $0.0177 \pm 0.002 \text{ cm}$.

UV-visible absorption. Absorption spectra were recorded on Cary 3 or Cary 300 (Varian) spectrophotometer. The UV-visible spectra of wax films were recorded on a Cary 300 equipped with the DRA-CA-30I sphere accessory (Labsphere), by measuring both the transmittance and reflection of the wax films and using barium sulfate as a reflectance standard. The films being sufficiently thin to be transparent, the absorbance A was calculated according: $A = \log((100-R)/T)$, where $100-R$ is the percentage of light transmitted by a pure wax film and T the percentage of light transmitted by the wax film containing the sensitizer.

Irradiations. Solutions were irradiated in a quartz cuvette (1 cm path length) using a 200 W mercury arc lamp equipped with a Schoeffel monochromator supplied by Bausch and Lomb. For irradiations in the solid state, wax fragments were set on a microscope slide and irradiated with the same device except that the light intensity was reduced using a neutral filter (MTO s7108), transmitting 25% of the light intensity. For samples containing P, the irradiation wavelength was set at 365 nm and for those containing K or V, it was set at 313

nm. Potassium ferrioxalate was used as chemical actinometer according to the method described by Calvert and Pitts¹⁴.

DPBF analysis. Losses of DPBF both in solution and solid state were measured by fluorescence using a method described by Wozniac et al. ($\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 454 \text{ nm}$)¹⁵. It was previously determined that none of the reagents and compounds used in our experiments had an interfering fluorescence signal with DPBF. The reaction of fluorescent DPBF with singlet oxygen yields dibenzoyl benzene, a non-fluorescent compound. We note that DPBF reacts also but slowly with triplet oxygen, for this reason all the solutions and films were prepared just before the irradiations and kept in the dark. Measurements in solution were performed on a Perkin-Elmer spectrofluorimeter MPF-3L connected to a Jobin Yvon spectrocomputer 3. The excitation and emission slits were set at 4 nm. Measurements were made in triplicate. Fluorescence was measured directly in the irradiated quartz cell. The absorbance of DPBF being always less than 0.1, we supposed that the measured fluorescence intensities were proportional to the concentrations of DPBF in the solutions. Measurements in the solid state were performed on a Perkin Elmer LS 55 luminescence spectrometer, data being processed with FL Winlab. For each data, five films were irradiated and for each film five measurements were performed. This was necessary because all films did not show the same thickness rigorously and in the spectrofluorimeter the sample was not set exactly at the same place. Dark control experiments and irradiation of DPBF in the absence of sensitizer were conducted systematically. The same number of replicates was made. We also checked that under prolonged irradiation DPBF completely disappeared when it was alone or in the presence of sensitizer.

Results and discussion

Singlet oxygen production in solvents. DPBF is a commonly used compound to trap singlet oxygen due to a good trapping efficiency¹⁶. However in our irradiation conditions (313 and 365 nm), DPBF absorbs (see Fig 2) and undergoes direct photolysis.

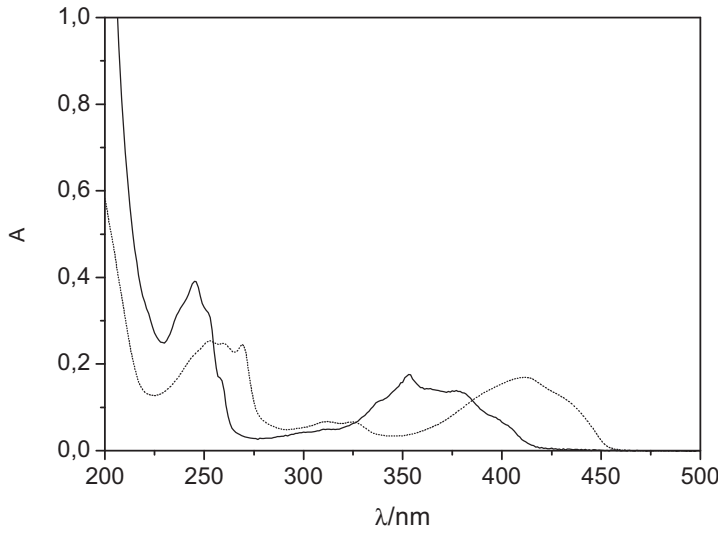


Fig. 2. Absorption spectrum of phenalenone (solid line, 10^{-5} M) and DPBF (dotted line, 10^{-5} M) in heptane.

Thus the rate of DPBF loss, r_{DPBF} , was given by eq. 1:

$$r_{DPBF} = r_{DPBF}^d + r_{DPBF}^s \quad \text{eq. 1}$$

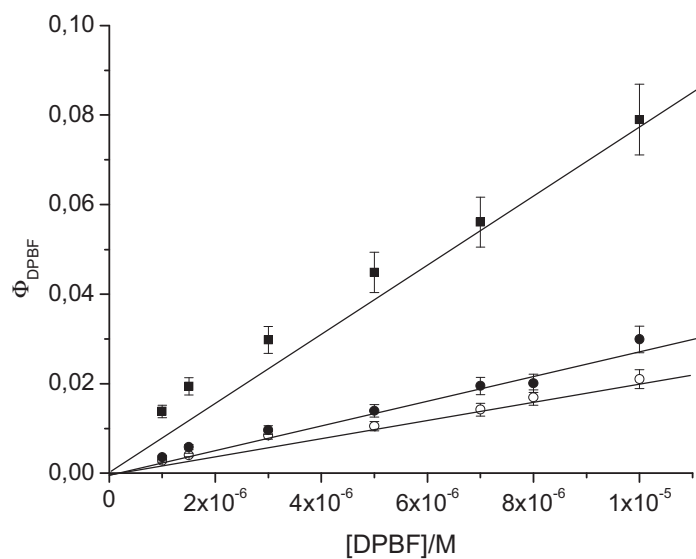
where r_{DPBF}^d is the rate of direct photolysis and r_{DPBF}^s is the rate of the sensitized reaction. In air-saturated heptane and acetonitrile solutions, the oxygen concentration is high ($\sim 2 \times 10^{-3}$ M) and one can make the hypothesis that sensitizer triplets are essentially trapped by oxygen. The other possible reactions (reduction of triplet sensitizer by DPBF or by solvents and oxidation of triplet DPBF by ground state sensitizer) are minor at the best. First, DPBF and sensitizers concentrations are low, less than 10^{-5} M, compared to the oxygen concentration and acetonitrile and heptane are poor hydrogen donors. Second, we checked that sensitizers did not disappear within the time scale of the experiments when they are irradiated in the presence of DPBF. r_{DPBF}^s is equal to $I_a \times \Phi_{DPBF}$ with I_a , the rate of photon absorption by the sensitizers and Φ_{DPBF} given in eq. 2:

$$\Phi_{DPBF} = \Phi_{\Delta} \times \left(\frac{k_r [DPBF]}{k_d + k_r [DPBF]} \right) \quad \text{eq.2}$$

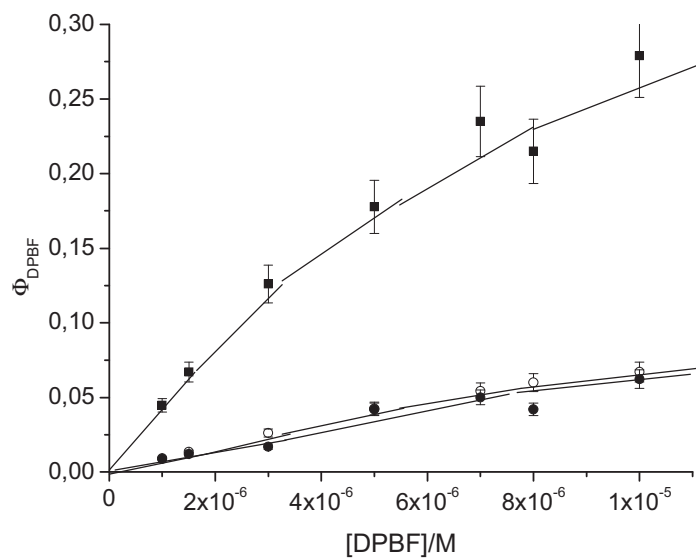
where k_d is the decay rate constant of singlet oxygen and k_r is the rate constant of the reaction of DPBF with 1O_2 in the solvents¹⁶. r_{DPBF}^d accounted for 10 to 15% of r_{DPBF} at $[DPBF] = 10^{-6}$ M and for 20 to 30 % at $[DPBF] = 5 \times 10^{-6}$ M. Φ_{DPBF} was calculated by subtracting

r_{DPBF}^d from r_{DPBF} and by dividing the result by I_a . Variations of Φ_{DPBF} vs [DPBF] in heptane and acetonitrile are shown Figure 3.

a)



b)



c)

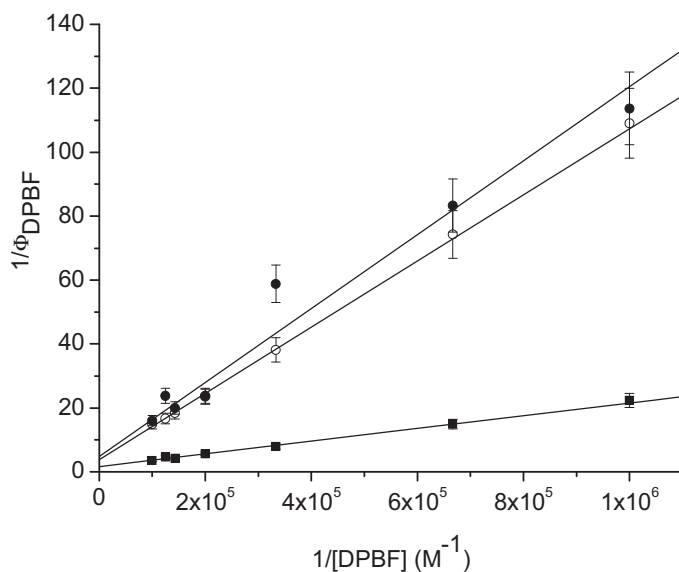


Figure 3: Plot of Φ_{DPBF} for P (■), K (●) and V (○) a) in heptane and b) in acetonitrile. c) Plots of $1/\Phi_{\text{DPBF}}$ vs $1/[\text{DPBF}]$ in acetonitrile.

For the experiments in heptane, the plots are linear showing that $k_r \times [\text{DPBF}]$ is negligible behind k_d . The slopes are thus close to $\Phi_{\Delta} \times k_r / k_d$. For phenalenone, one gets $9640 \pm 600 \text{ M}^{-1}$ with a correlation coefficient of 0.992. Taking $^1\Phi_{\Delta} = 0.97^{9-11}$, one gets $k_r / k_d = 9900 \pm 600 \text{ M}^{-1}$. Taking for k_d the value given in cyclohexane, another alkane ($5.9 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$)¹⁶, one computes $k_r = 5.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. From the other linear plots, we measure $\Phi_{\Delta} \times k_r / k_d = 3030 \pm 200 \text{ M}^{-1}$ and $R^2 = 0.975$ for K and $\Phi_{\Delta} \times k_r / k_d = 2320 \pm 120 \text{ M}^{-1}$ and $R^2 = 0.981$ for V. Using $k_r / k_d = 9900 \text{ M}^{-1}$ from experiments with P, one finally gets $\Phi_{\Delta} = 0.306 \pm 0.036$ for K and $\Phi_{\Delta} = 0.234 \pm 0.026$ for V.

In acetonitrile, the plots Φ_{DPBF} vs $[\text{DPBF}]$ are not linear (Figure 3B). This is likely due to the slower physical deactivation of singlet oxygen in this solvent ($1.7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$)¹⁰. Consequently, $k_r \times [\text{DPBF}]$ is not negligible behind k_d within the concentration range of DPBF chosen. Linearization of eq.2 was thus performed to measure Φ_{Δ} and k_r / k_d . Figure 3C shows the variations of $1/\Phi_{\text{DPBF}}$ vs $1/[\text{DPBF}]$ for P, K and V, that are satisfactorily linear. The intercepts are equal $1/\Phi_{\Delta}$ and the slopes to $k_d / (k_r \times \Phi_{\Delta})$. For phenalenone one gets an intercept of 1 and a slope of $(2.0 \pm 0.17) \times 10^{-5} \text{ M}$, $R^2 = 0.986$. This gives $k_r / k_d = 50250 \pm 4200 \text{ M}^{-1}$. It can be deduced that $k_r = 8.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, in good accordance with the literature data (6.6×10^8 to $1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$

s^{-1})¹⁶. For K and V, the intercepts and slopes measured are 4.8 ± 0.2 , $(1.1 \pm 0.09) \times 10^{-4}$ M, $R^2=0.917$ and 3.9 ± 0.2 , $(1.0 \pm 0.08) \times 10^{-4}$ M, $R^2=0.996$. Using $k_r/k_d = 50250 \pm 4200 \text{ M}^{-1}$, one obtains a Φ_Δ comprised between 0.190 ± 0.017 for K and 0.226 ± 0.036 for V.

For visnagin, Φ_Δ does not vary so much with the solvent with the exception of water (Table 1). For K, a small decrease with increase polarity is observed.

For both, Φ_Δ lays within the range 0.17-0.34. This is significantly lower than the triplet quantum yields: 0.86 and 0.78, respectively in cyclohexane¹⁷. By nano second laser flash photolysis, we measured the reactivity of K and V triplets with ground state molecular oxygen. Bimolecular rate constants were found to $5.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $4.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, while triplets deactivation was less than $8 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ (ref¹⁸). Thus, more than 90% of triplets are trapped by oxygen in air-saturated heptane or acetonitrile solution. It can be deduced that about one third of the reaction between triplets and oxygen yields singlet oxygen, the two other thirds giving deactivation.

Singlet oxygen production in wax films. According to the Beer-Lambert's law, the absorbance of a compound depends on the path length, the concentration and the extinction coefficient. The paraffin wax films prepared were too thin (~ 0.011 cm thick) to allow measurement of the absorbance at low sensitizer concentration (10^{-4} M). The absorbance in thicker films could not be measured either because of light scattering. To overcome this, we measured the absorbances at high sensitizer concentration (1.3×10^{-2} M for P, 3×10^{-2} M for K and 2×10^{-2} M for V) using an integrating sphere. From these values we extrapolated absorbances for less concentrated samples. Before that, we checked the validity of the Beer-Lambert's law in the high concentrations range by setting a calibration curve. This was achieved using KBr pellets containing P ranging from $5.25 \times 10^{-2} \%$ to $3.6 \times 10^{-1} \%$ (w/w). As seen in Figure 4, the absorbance increases linearly with the percentage of P in the pellets.

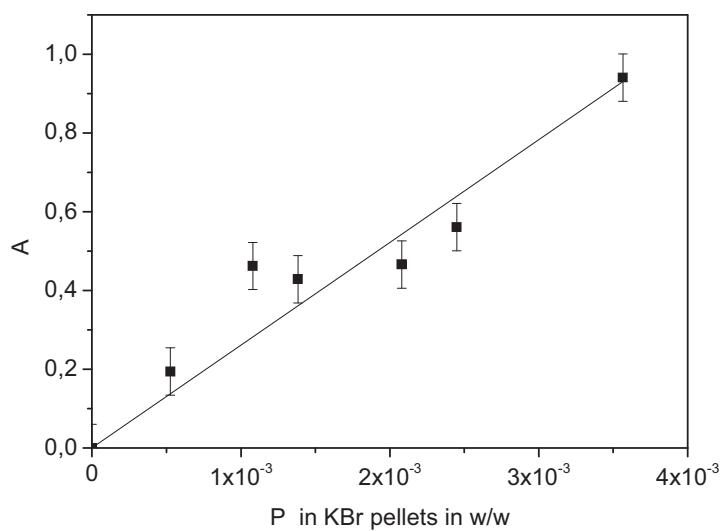


Figure 4 : Variation of the absorbance at 380 nm of KBr pellets containing variable amounts of P.

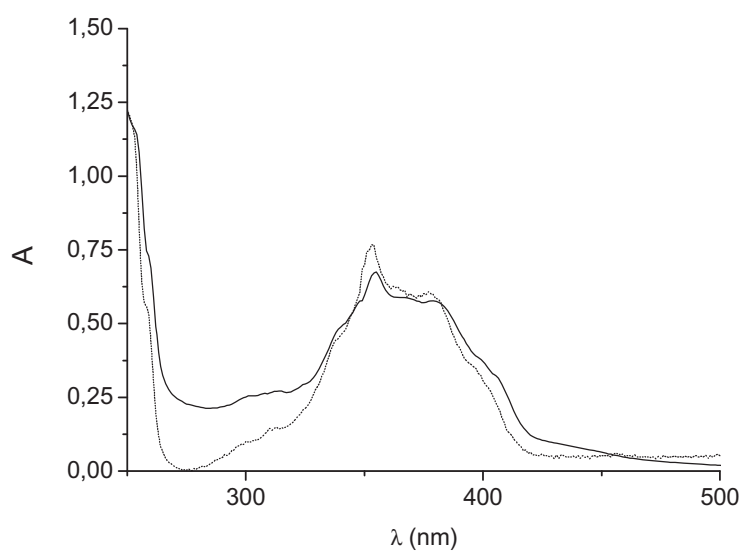


Fig.5A. Absorption spectrum of P in wax film (solid line) and in heptane (dotted line). Spectra were normalized at 365 nm.

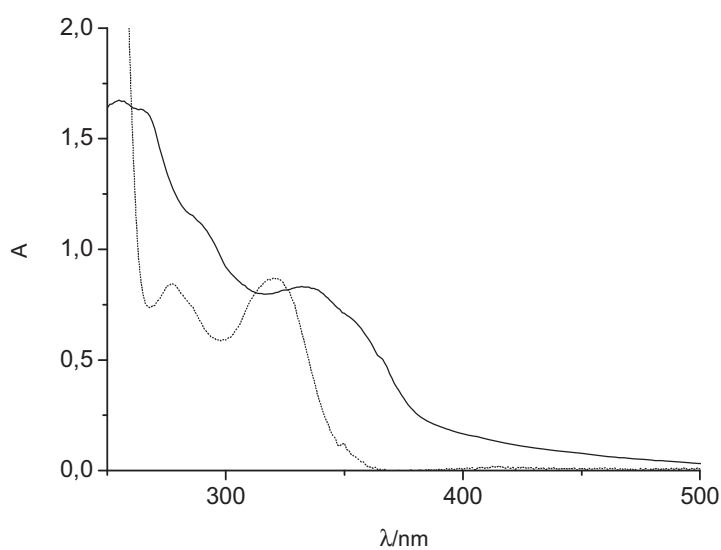


Fig.5B. Absorption spectrum of K in wax film (solid line) and in heptane (dotted line). Spectra were normalized at 325 nm.

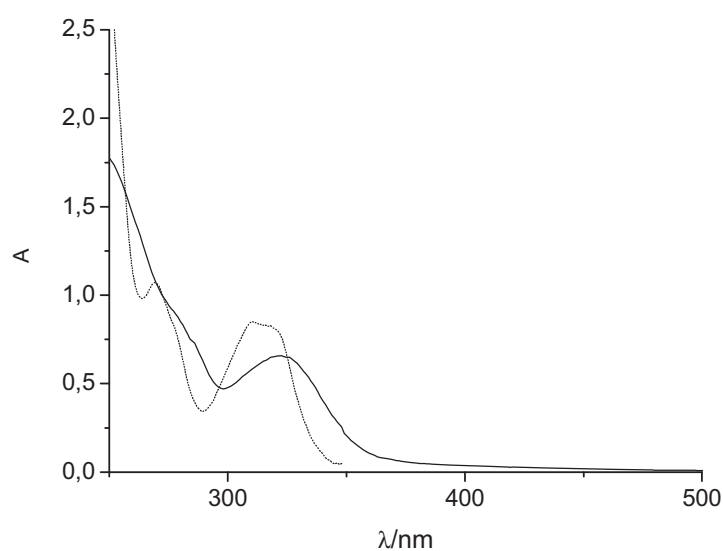


Fig.5C. Absorption spectrum of V in wax film (solid line) and in heptane (dash line). Spectra were normalized at 325 nm.

The absorption spectra in heptane and in wax are compared Fig 5. For P, spectra in wax and in heptane show close maxima. For V and K, spectra are somewhat different; the maxima

in wax are red-shifted by 10 nm compared to heptane and the long-wavelength bands are broader showing interactions with the solid.

As for experiments in solution, DPBF underwent both direct and sensitized reactions. Thus, r_{DPBF}^S was obtained by subtracting the rate of direct photolysis from r_{DPBF} . Then, Φ_{DPBF} was calculated by dividing r_{DPBF}^S by I_a . As in heptane, the plots Φ_{DPBF} vs $[DPBF]$ are linear (Figure 6). The slope and coefficient of correlation in the paraffin wax are: $22000 \pm 1500 \text{ M}^{-1}$, $R^2 = 0.957$ for P; $6200 \pm 300 \text{ M}^{-1}$, $R^2 = 0.986$ for K and $3600 \pm 200 \text{ M}^{-1}$, $R^2 = 0.883$ for V.

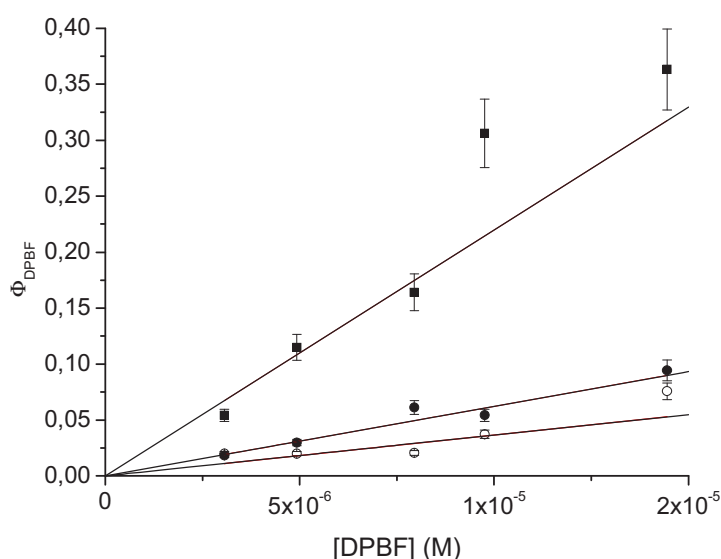


Fig. 6. $\Phi_{DPBF} = f([DPBF])$ using P (■), K (●) and V (○) as the sensitizer in paraffin wax.

In wax as in solution, Φ_{DPBF} varies with $[DPBF]$ according to eq.2. Considering that molecules in wax show much less mobility than those in solution, rate constants may be different in the two media. For instance, reduction of triplet sensitizers by paraffin may occur competitively to the reaction with oxygen leading to a decrease of singlet oxygen quantum yield¹¹. For this reason, we shall not postulate that $\Phi_{\Delta} = 0.97$ for P as it was done in solution. However, as photoreactions have been studied in the same conditions for P, K and V, one can estimate that the slopes obtained from data of Fig. 6 give the relative ability of these sensitizers to produce singlet oxygen. One gets that K and V generate singlet oxygen in wax films as in solution with ability 3.54 and 6.11 times lower than P respectively. This is quite close to results obtained in heptane.

Conclusion

We measured the ability of the two phytoalexins khellin and visnagin to generate singlet oxygen in heptane, acetonitrile and in wax films. Using phenalenone as a reference, we find that the singlet oxygen production of both compounds is significant and is close in heptane and in the paraffinic wax which are media of similar polarity. Future research will focus on the photosensitized transformation of pesticides on and in films containing these phytoalexins to better understand the fate of pesticides on irradiated leaves. The model could be also improved by including other components of leaf waxes.

References

1. Kunst, L.; Samuels, A. L. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in lipid research* (2003) 42, 51-80.
2. Kolattukudy, P. E. Lipid-derived defensive polymers and waxes and their role in plant-microbe interaction; New York: Academic, 1987; Vol. 9.
3. Berenbaum, M. R.; Larson, R. A. Flux of singlet oxygen from leaves of phototoxic plants. *Experientia* (1988) 44, 1030-1032.
4. Ter Halle, A; D., Drncova; Richard, C. Phototransformation of the herbicide sulcotrione on maize cuticular wax. *Environ. Sci. Technol.* (2006) 40, 2989-2995.
5. Baker, E. A. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In *The plant cuticle*, Cutler, D., Alvin, K. L., Price, C. E., Eds.; London, 1982; pp 139-166.
6. Tulloch, A. P. Chemistry of waxes of higher plants. In *Chem. Biochem. Nat. Waxes. General review*. 1976, 235-287.
7. Donhowe, G.; Fennema, O. Water vapor and oxygen permeability of wax films. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1993) 70, 867-873.
8. Redmond, R. W.; Gamlin, J. N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem. Photobiol.* (1999) 70, 391-465.
9. Schmidt, R.; Tanielian, C.; Dunsbach, R.; Wolff, C. Phenalenone, a universal reference compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) sensitization. *J. Photochem. Photobiol. A* (1994) 79, 11-17.
10. Flors, C.; Nonell, S. Light and singlet oxygen in plant defense against pathogens: phototoxic phenalenone phytoalexins. *Acc. Chem. Res.* (2006) 39, 293-300.
11. Oliveros, E.; Bossmann, S. H.; Nonell, S.; Martí, C.; Heit, G.; Tröscher, G.; Neuner, A.; Martínez, C.; Braun, A. M. Photochemistry of the singlet oxygen [$\text{O}_2(^1\Delta_g)$] sensitizer perinaphthenone (phenalenone) in N,N'-dimethylacetamide and 1,4-dioxane. *New J. Chem.* (1999) 23, 85-93.
12. K.Vinodgopal, P.V. Kamat Photochemistry on Surfaces. Photodegradation of 1,3 diphenylisobenzofuran over metal oxide particles. *J. Phys. Chem.* (1992) 96, 5053-5059.

13. Kaye, G.W.C. ; Laby, T. H. Mechanical properties of materials. In *Kaye and Laby Tables of Physical and Chemical Constants*, National Physical Laboratory, Ed.; 2008.
14. Calvert, J. G.; Pitts, J. N. Photochemistry; New York, 1966.
15. Wozniak, M.; Tanfani, F.; Bertoli, E.; Zolese, G.; Apreaa, C.; Antosiewicz, J. A new fluorescence method to detect singlet oxygen inside phospholipid model membranes. *Biochim. Biophys Acta* (1991) 1082, 94-100.
16. Wilkinson, F.; Brummer, J.G. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* (1981) 4, 809-999.
17. Borges, M.L.; Latterini, L.; Elisei, F.; Silva, P.F.; Borges, R.; Becker, R. S.; Macanita, A.L. Photophysical properties and photobiological activity of the furanochromones visnagin and khellin. *Photochem. Photobiol.* (1998) 67, 184-191.
18. Monadjemi, S.; Richard, C. personal communication

5.2 Photodégradation de la cycloxydime sur cire.

Les études présentées au paragraphe 4 ont permis de démontrer que CD se dégrade par photodégradation directe et sensibilisée avec K et V en solution. Afin de vérifier si ceci est aussi valable sur support solide, ce qui est plus représentatif du modèle foliaire, CD a été déposé sur des films de paraffine contenant K ou V et les échantillons ont été irradiés dans un simulateur de lumière solaire. Le choix des quantités de K et de V ajoutés dans la cire de paraffine est basé sur un article décrivant le pourcentage massique de ces deux molécules dans différents organes de la plante *Ammi visnaga*³.

Les cires ont été préparées en incluant 0,5% en masse des phytoalexines. Un volume de 1 ml de solution de CD à 5×10^{-5} M préparée dans l'acétonitrile a été déposé sur les films de cire. Après évaporation du solvant, la concentration surfacique en CD est donc de 200 g/ha ce qui correspond aux doses agricoles. Les films ont ensuite été irradiés à 500 Wm^{-2} dans un simulateur de lumière solaire et rincés avec 1 ml d'acétonitrile pour être finalement analysés par HPLC-UV. Les cinétiques de premier ordre apparent obtenues pour la phototransformation de CD sur film de cire pure, cire contenant 0,5% de K et cire contenant 0,5% de V sont présentées à la Figure VI.18.

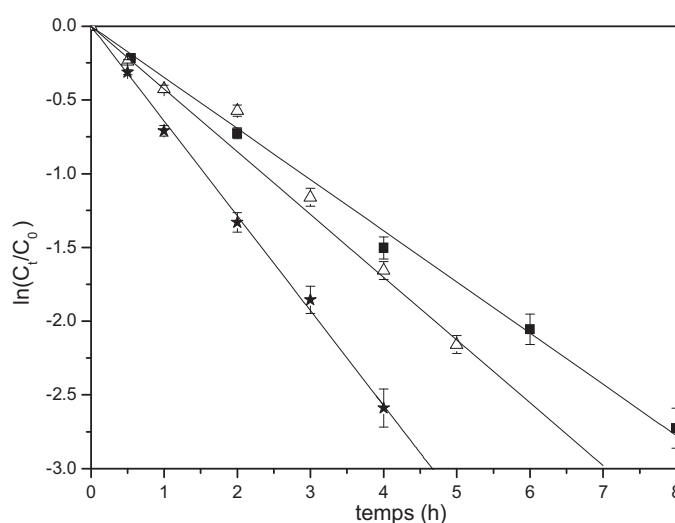


Figure VI.18 : Photodégradation du CD sur film de cire pure (■), contenant 0,5% de khellin (△) et contenant 0,5% de visnagin (★).

La constante de vitesse de phototransformation de CD sur film de cire pure est de $0,35 \text{ h}^{-1}$ et sur les cires contenant K et V de $0,42 \text{ h}^{-1}$ et $0,64 \text{ h}^{-1}$ respectivement. Ce résultat est admissible car on ne peut s'attendre qu'à de la photodégradation directe sur la cire de paraffine pure tandis que sur les cires contenant K ou V, la voie sensibilisée est ajoutée. De plus il y a une nette différence entre les cinétiques de K et de V bien que le pourcentage massique de ces deux molécules dans les films de cire soit identique.

Pourtant, dans l'article présenté ci-dessus, nous n'avons pas constaté de différence considérable entre les Φ_{Δ} de K et de V dans la cire de paraffine tout en tenant compte des incertitudes de mesures. La disparité des constantes de vitesse de phototransformation de CD sur les cires contenant K ou V est attribuée aux réactions d'oxydation sensibilisées de type I : comme nous l'avons montré au paragraphe 4 et comme il a été évoqué dans la littérature⁵, V est un meilleur sensibilisateur de type I que K.

6. Conclusion

La khellin et le visnagin sont deux phytoalexines de structure très proches qui ont déjà fait l'objet de travaux dans la littérature. Elles présentent des propriétés photophysiques également assez proches. Dans les solvants organiques peu polaires, les rendements de transition inter-système sont compris entre 0,77 et 0,86 et les Φ_{Δ} entre 0,26 et 0,53. Toutefois aucune donnée n'est disponible dans l'acétonitrile. Etant donné que nous avons choisi ce solvant pour l'étude de la réactivité photochimique de CD, nous avons été amenés à déterminer les principaux paramètres cinétiques des deux phytoalexines dans ce solvant.

Nous avons mesuré les Φ_{Δ} dans l'acétonitrile ; nous avons trouvé entre 0,19 et 0,23. Par ailleurs, toujours en solution, nous avons cherché à savoir si les triplets de ces deux phytoalexines oxydaient CD. Par photolyse laser on a montré que CD a un double effet sur le triplet du visnagin : il le désactive avec une constante de vitesse de $1,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ et l'oxyde. La constante de vitesse de réaction a été obtenue par modélisation des données cinétiques mesurées en irradiation continue. Nous avons obtenu $k_r = 1,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

En détaillant les réactions photochimiques intervenant lors de la phototransformation de CD en présence du sensibilisateur V, nous avons pu estimer la vitesse de phototransformation directe et sensibilisée de celle-ci. Les résultats obtenus coïncident bien avec les valeurs théoriques. En milieu désoxygéné, CD disparaît essentiellement par oxydation *via* $^3\text{V}^*$; la part de phototransformation directe de CD ne comptant que pour 5% de la disparition totale. En solution aérée, on mesure près de 50% de photolyse directe, 25% de voie sensibilisée par $^3\text{V}^*$ et 25% de voie impliquant $^1\text{O}_2$. Ces résultats montrent que CD est une molécule aisément oxydable.

Lorsque la khellin et le visnagin sont inclus dans la cire de paraffine, on observe également une formation d'oxygène singulet. Celle-ci a été dosée en incluant une sonde chimique dans la cire, le 1,3-diphénylisobenzofurane. Ils génèrent de l'oxygène singulet, entre 3,5 et 6,1 fois moins que la phénalénone dans les mêmes conditions. Dans une dernière étape, CD a été appliqué sur des films de cire contenant les phytoalexines. Sa phototransformation est nettement plus rapide que sur film pur. Ces expériences sont particulièrement convaincantes du fait qu'elles ont été menées cette fois avec des sensibilisateurs naturellement présents dans les plantes et non un sensibilisateur « modèle ».

Références

1. Berenbaum, M. R.; Larson, R. A. Flux of singlet oxygen from leaves of phototoxic plants. *Experientia* **1988**, *44*, 1030-1032.
2. Redmond, R. W.; Gamlin, J. N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 391-465.
3. Franchi, G. G.; Bovalini, L.; Martelli, P.; Ferri, S.; Sbardellati, E. High performance liquid chromatography analysis of the furanochromones khellin and visnagin in various organs of *Ammi Visnaga* (L.) Lam. at different developmental stages. *J. Ethnopharmacol.* **1985**, *14*, 203-212.
4. Pan, J. X.; Han, Z. H.; Miao, J. L.; Yao, S.-D.; Lin, N.-Y.; Zhu, D.-Y. Furanochromone radical cations: generation, characterization and interaction with DNA. *Biophys. Chem.* **2001**, *91*, 105-113.
5. Borges, M. L.; Latterini, L.; Elisei, F.; Silva, P. F.; Borges, R.; Becker, R. S.; Maçanita, A. L. Photophysical properties and photobiological activity of the furanochromones visnagin and khellin. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *67*, 184-191.
6. Flors, C.; Nonell, S. Radical species derived from phenalenone: characterization and role of upper excited states. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2004**, *163*, 9-12.
7. Fersi, H.; Platz, M. S. Nanosecond time-resolved infrared studies of visnagin and khellin triplets and radical ions. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 9206-9212.
8. Franco, C.; Olmsted, J. I. Photochemical determination of the solubility of oxygen in various media. *Talanta* **1990**, *37*, 905-909.
9. Ph. Fournier de Violet. Polyhalide radical anions as intermediates in chemistry. *Rev. Chem. Intermed.* **1981**, *4*, 121-169.
10. Rodgers, M. A. J. Solvent-induced deactivation of singlet oxygen: additivity relationships in nonaromatic solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6201-6205.
11. Merkel, P. B.; Kearns, D. R. Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. An experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 7244-7253.
12. Nicholson, R.; Wood, K. Phytoalexins and secondary products, where are they and how can we measure them? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2001**, *59*, 63-69.

CHAPITRE VII

CARACTERISATION DES PHOTOPRODUITS DE LA CYCLOXYDIME

1. Introduction

La phototransformation d'une substance active sur la culture conduit à la formation de photoproduits. Ces derniers peuvent s'accumuler sur la feuille ou pénétrer dans la plante. Il est indispensable de déterminer leur nature afin d'évaluer leur toxicité et les risques qu'ils font courir à l'environnement et au consommateur.

Ce chapitre est consacré à l'analyse des photoproduits de la cycloxydime (CD). L'étude a été réalisée par HPLC-DAD couplée à la spectrométrie de masse. L'objectif est de comparer les photoproduits issus de la photodégradation directe avec ceux formés par sensibilisation, à la fois en solution et sur les supports solides modélisant la surface foliaire.

Les études en solution ont été menées dans l'acétonitrile et sous irradiation monochromatique. Deux types de sensibilisateurs ont été employés pour les études en solution: la phénalénone qui présente un Φ_A de proche de l'unité et la cercosporin qui est un sensibilisateur naturellement produit par une espèce de champignon foliaire, la *Cercospora*, dont le Φ_A est également élevé. Une description plus détaillée de cette toxine sera donnée au chapitre suivant. En solution, sont comparés les photoproduits issus:

- de la photolyse directe de CD sous irradiation monochromatique à 313nm,
- de la phototransformation sensibilisée par la phénalénone (P) sous irradiation monochromatique à 365 nm,
- de la phototransformation sensibilisée par la cercosporin (CSP) sous irradiation monochromatique à 434 nm.

Les expériences sur support solide ont été effectuées en déposant CD sur des films de cire de paraffine qui ont ensuite été irradiés dans un simulateur de lumière solaire. Plusieurs films de cire ont été utilisés :

- film de cire de paraffine pure,
- film de cire de paraffine contenant de la phénalénone (P),
- film de cire de paraffine contenant de la khellin (K),
- film de cire de paraffine contenant du visnagin (V).

Le taux de conversion au bout duquel les échantillons ont été analysés est compris entre 25 et 40%. Il est fort compliqué de parvenir au même taux de conversion pour tous les échantillons bien que la constante de vitesse de photodégradation soit connue pour chacune des expériences ; ceci est dû au fait que la mesure de cette dernière implique une moyenne sur quatre répliquats.

2. Détection des photoproduits en solution

Toutes les analyses par spectrométrie de masse ont été menées en mode positif. La concentration initiale en CD était de 10^{-4} M pour chacune des solutions. Sur la Figure VII.1 sont présentés les TIC (total ion chromatogram) pour une solution de CD non irradiée, une solution de CD irradiée 15 minutes à 313 nm, une solution de CD contenant CSP (commercial) irradiée 15 minutes à 435 nm et une solution de CD contenant P à 5×10^{-5} M irradiée 5 minutes à 365 nm. La faible disponibilité en CSP ne nous a pas permis de procéder par pesée pour déterminer la concentration de la solution. Seule l'absorption de la CSP dans la solution mélange est connue ($A_{435\text{nm}} = 0,390 \pm 0,05$). Dans les solutions contenant CSP, le sensibilisateur est sélectivement irradié car l'absorbance de CD à 10^{-4} M à 435 nm est nulle. A 365 nm, l'absorbance de CD est de 0,06, mais nous avons vérifié que le taux de conversion de CD à 10^{-4} M au bout de 5 minutes d'irradiation était négligeable devant celui mesuré en présence de P au bout du même temps d'irradiation.

A chaque pic de ce chromatogramme correspond un spectre de masse qui s'étend de 100 à 1000 m/z. Pour chaque pic de la Figure VII.1, le rapport m/z des ions est mesuré et indiqué. L'analyse ayant été réalisée en mode positif, les molécules sont détectées sous forme d'ions à $[M+H]^+$ soit M+1 ou à $[M+Na]^+$ soit M+23. Dans les chromatogrammes TIC, l'intensité de chaque pic est proportionnelle à la quantité de l'ion mesuré. Notons cependant que chaque molécule présente un coefficient de réponse qui lui est propre et que l'on ne peut déterminer que si on a un authentique. Dans la solution non irradiée, on peut distinguer deux isomères de CD dont les temps de rétention sont de 12 et 17 minutes (Figure VII.1). Ces deux pics ont un rapport m/z égal à 326 ce qui correspond à l'ion $[CD+H]^+$. L'analyse HPLC en phase inverse indique que le composé à 17 minutes est moins polaire que celui détecté à 12 minutes. Il est donc tout à fait cohérent que le composé à 17 minutes soit l'isomère *E* qui est moins polaire à cause de la liaison intramoléculaire de la molécule. Ce résultat est aussi en accord avec ceux présentés au chapitre V. Notons que l'isomère *Z* est à peine détectable lorsqu'une solution de CD à 10^{-4} M est analysée par HPLC-DAD.

L'examen des chromatogrammes de la Figure VII.1 montre que les principaux photoproduits formés en solution correspondent aux ions à m/z 282, 298, 342 et 358 :

- les ions 342 et 358 sont observés dans les solutions de CD pur et les mélanges CD+sensibilisateur,
- l'ion 282 est surtout détecté dans la solution irradiée à 313 nm,
- l'ion de m/z à 298 n'est détectable que dans les solutions contenant P,
- les ions de masse 342 et 358 apparaissent à plusieurs temps de rétention ce qui révèle que ces composés sont présents sous forme d'isomères.

Afin d'identifier la structure des produits de dégradation, ceux-ci ont été analysés par spectrométrie de masse MS/MS : cette technique consiste à isoler en masse des ions puis à les fragmenter en fournissant une énergie de collision suffisante. Le spectre de masse obtenu, appelé spectre MS/MS, renseigne sur la structure chimique de l'ion isolé grâce à ses fragments observés. Les spectres MS/MS obtenus sont présentés au § 5.

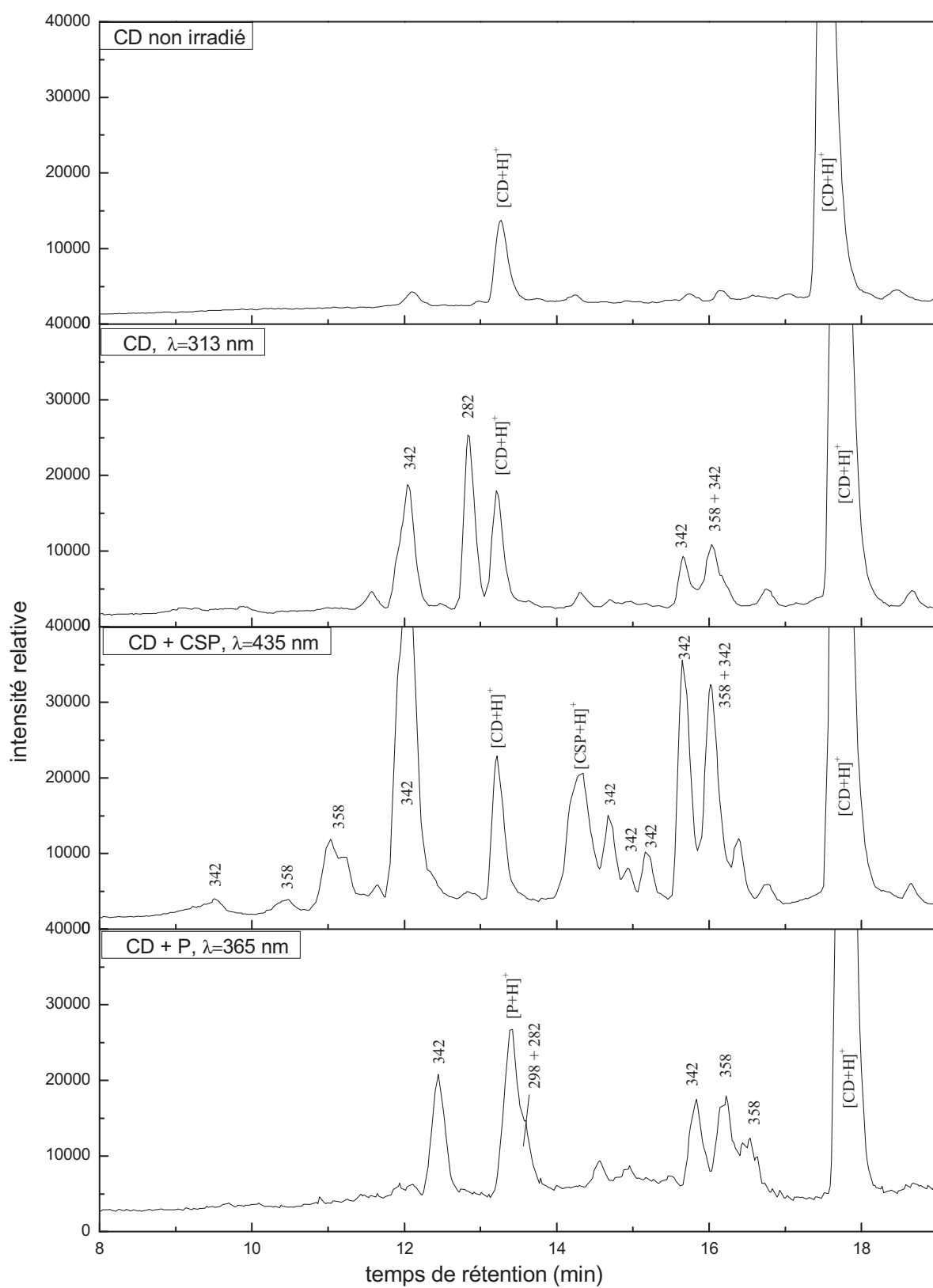


Figure VII.1: Chromatogrammes TIC en mode positif des solutions de CD préparées dans l'acétonitrile. Les valeurs de m/z des ions sont indiquées pour chaque pic.

3. Détection des photoproduits sur support solide

Les photoproduits de CD sur cire pure ou contenant un sensibilisateur ont été analysés par spectrométrie de masse. Cette analyse a été uniquement réalisée sur les échantillons de cire pure et de cire contenant P. Etant donné que les mêmes photoproduits de CD ont été retrouvés sur cire contenant P, K ou V ainsi que pour la formulation de CD sur support solide, seuls les chromatogrammes UV-Visible de ces derniers sont présentés au § 6 de ce chapitre. Les échantillons ont été préparés en déposant une solution de CD à 5×10^{-5} M préparée dans l'acétonitrile sur les films de cire de manière à atteindre une concentration surfacique de 200 g/ha. Le dépôt a été réalisé sur des films de cire de paraffine pure ou contenant 2×10^{-2} % en phénalénone. Après irradiation au Suntest à 500 Wm^{-2} , les films ont été rincés avec de l'acétonitrile et la solution récupérée a été analysée. Les TIC obtenus sont présentés Figure VII.2. Le rapport m/z des ions est indiqué pour chaque pic du chromatogramme. A l'exception des ions 341 et 369, les mêmes photoproduits sont formés sur cire pure ou cire contenant P. Les photoproduits ont été identifiés par spectrométrie de masse MS/MS et leurs structures sont présentés au paragraphe 4.

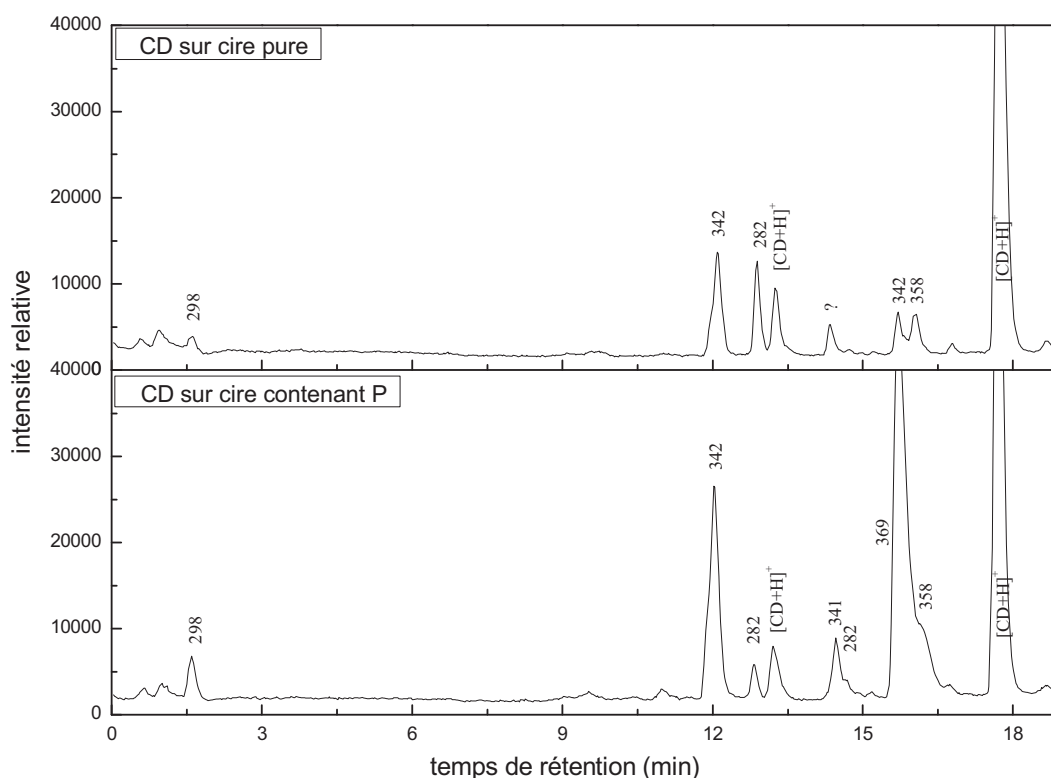


Figure VII.2 : Chromatogramme TIC en mode positif des échantillons de CD irradiés sur film de cire de paraffine pure ou contenant P, dans un simulateur de lumière solaire. Les valeurs de m/z sont indiquées pour chaque pic.

4. Comparaison des résultats en solution et sur cire

Afin de faciliter la comparaison des ions détectés en solution et sur support solide, un tableau récapitulatif est présenté ci-dessous. La masse des ions détectés est connue à quatre décimales près. De ce fait, la masse de chaque ion détecté peut être calculée par le logiciel MassLynx qui propose une formule brute associée à une masse exacte. Cette dernière est la somme des masses monoisotopiques des atomes la constituant, la masse de l'isotope le plus abondant étant généralement pris en compte pour calculer la masse exacte.

La masse exacte la plus proche de la masse détectée est retenue dans la mesure où la formule brute associée est cohérente avec la composition chimique initiale du pesticide. Les ions étant formés par électrospray en mode positif, ils sont protonés. Les formules brutes des molécules neutres correspondant aux ions détectés possèdent donc un atome d'hydrogène en moins (Tableau VII.1). Les structures chimiques des composés détectés ont été ensuite identifiées par spectrométrie MS/MS en utilisant les données sur les fragments.

Tableau VII.1 : Ions détectés en mode positif après irradiation de la cycloxydime en solution ou sur film de cire.

m/z	ion	formule brute moléculaire	irradiations monochromatiques dans l'acétonitrile			irradiations sous lumière solaire simulée sur solide	
			CD 313nm	CD + P 365nm	CD + CSP 435nm	CD sur cire pure	CD sur cire + P
535	[CSP+H] ⁺	C ₂₉ H ₂₆ O ₁₀			x		
326	[CD+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₇ NO ₃ S	x	x	x	x	x
181	[P+H] ⁺	C ₁₃ H ₈ O		x			
282	[A+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₃ NO ₂ S	xx	x		xx	x
298	[B+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₃ NO ₃ S		x		x	xx
341	[E+H] ⁺	C ₂₂ H ₄₄ O ₂					x
342	[C+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₇ NO ₄ S	x	xxx	xxx	x	xxx
358	[D+H] ⁺	C ₁₇ H ₂₇ NO ₅ S	x	xxx	xxx	x	xxx
369	[F+H] ⁺	C ₂₄ H ₄₈ O ₂					xxx

ion peu abondant : x

ion abondant : xx

ion très abondant : xxx

On constate que les ions 341 et 369 sont uniquement détectés sur cire. L'ion 298 est aussi principalement formé sur support solide. Les composés de m/z égal à 282, 342 et 358 sont quant à eux formés à la fois en solution et sur support solide.

5. Identification des photoproduits

En étudiant la fragmentation des ions par MS/MS, nous pouvons proposer des structures chimiques pour les photoproduits.

Spectre de masse de CD

Le spectre de masse de CD en mode positif est présenté Figure VII.3. Le pic de base correspond à l'ion moléculaire $m/z = 326$, c'est-à-dire à $[CD+H]^+$. Le pic à $m/z=280$ correspond à la fragmentation de CD par perte d'éthanol ($326-46$). L'ion 342 correspond à $[CD+O+H]^+$, c'est vraisemblablement un photoproduit élué en même temps que CD.

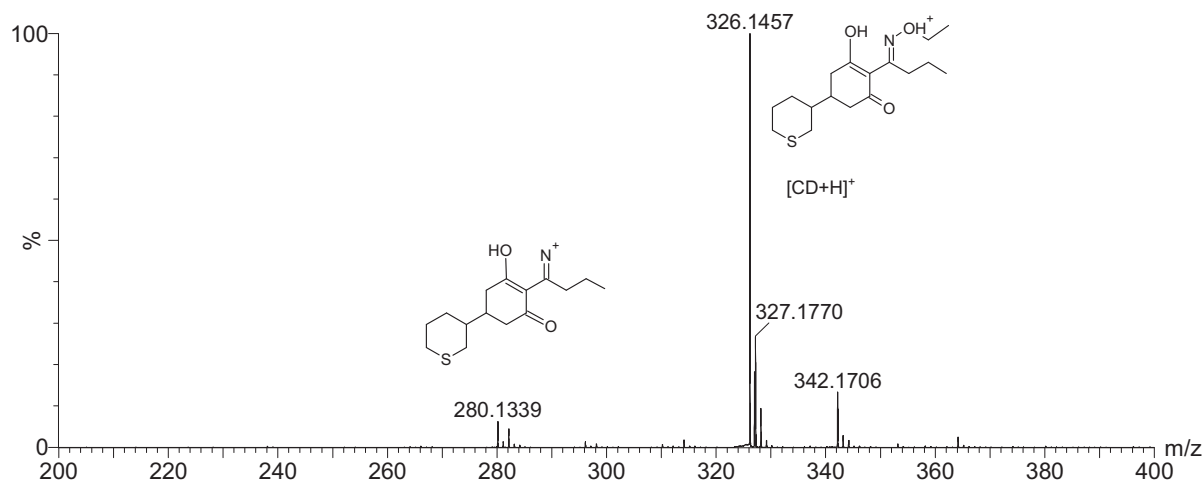


Figure VII.3 : Spectre de masse de CD en mode positif.

5.1 Photoproduits issus de la perte de l'éthoxylate (ions 282 et 298)

La Figure VII.4a présente le photoproduit A. L'analyse par spectrométrie de masse en mode positif de ce photoproduit conduit à l'ion de m/z 282 dont le spectre de fragmentation est donné Figure VII.4b.

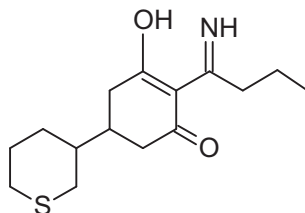


Figure VII.4a: Photoproduit A.

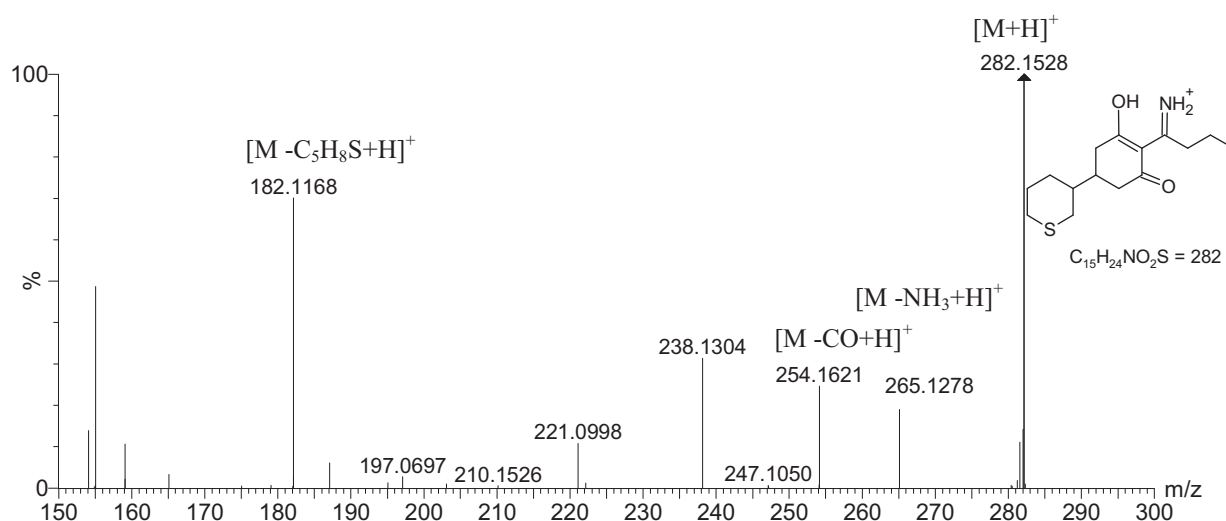


Figure VII.4b : Spectre de masse de la fragmentation de l'ion 282.

La formule brute de l'ion (photoproduit A protoné) est $C_{15}H_{24}NO_2S$. Cette formule indique que le photoproduit s'est formé après perte du groupement éthoxylate $[C_{17}H_{27}NO_3S-C_2H_4O+H^+]^+$. Les principaux fragments de l'ion 282 sont donnés Figure VII.4b. Il s'agit de l'ion $m/z=265$ (perte de NH_3), de l'ion 254 (perte de CO) et de l'ion 182 (perte du penthiophane).

La Figure VII.5a présente le photoproduit B. En mode positif, ce composé conduit à la formation de l'ion à $m/z=298$. Son spectre de masse est donné Figure VII.5b ; l'ion de masse 214 éventuellement fragment du 298 n'a pas été identifié.

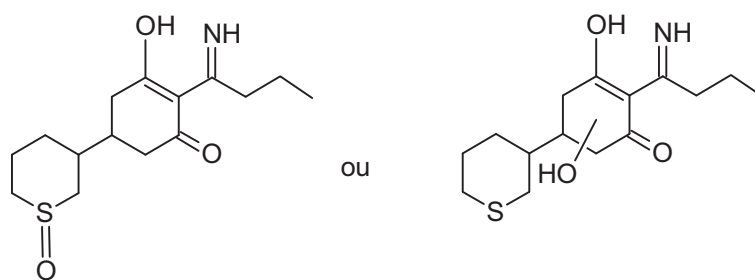


Figure VII.5 a: Structures possibles pour le photoproduit B.

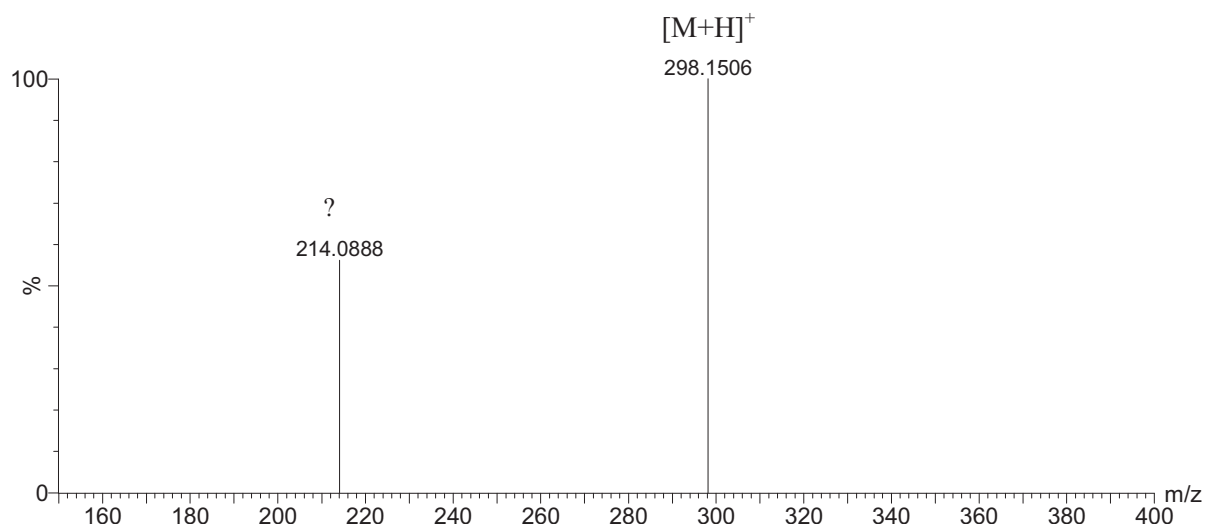


Figure VII.5b : Spectre de masse de l'ion 298.

La formule brute de l'ion de masse 298 est $C_{15}H_{24}NO_3S$. Cet ion résulte de la perte du groupement éthoxylate et d'une addition d'un atome d'oxygène $[C_{17}H_{27}NO_3S-C_2H_4O+O+H]^+$. La fragmentation ne permet pas de déterminer où a lieu l'oxydation. Deux structures sont donc proposées : l'oxydation a lieu soit sur le cyclohexane soit sur l'atome de soufre (Figure VII.5a).

5.2 Produits issus de l'oxydation

La Figure VII.6a présente la structure proposée pour le photoproduit C. L'analyse par spectrométrie de masse en mode positif de ce photoproduit conduit à l'ion de m/z 342 dont le spectre de fragmentation est donné Figure VII.6b.

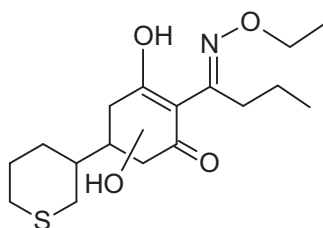


Figure VII.6a : Photoproduit C

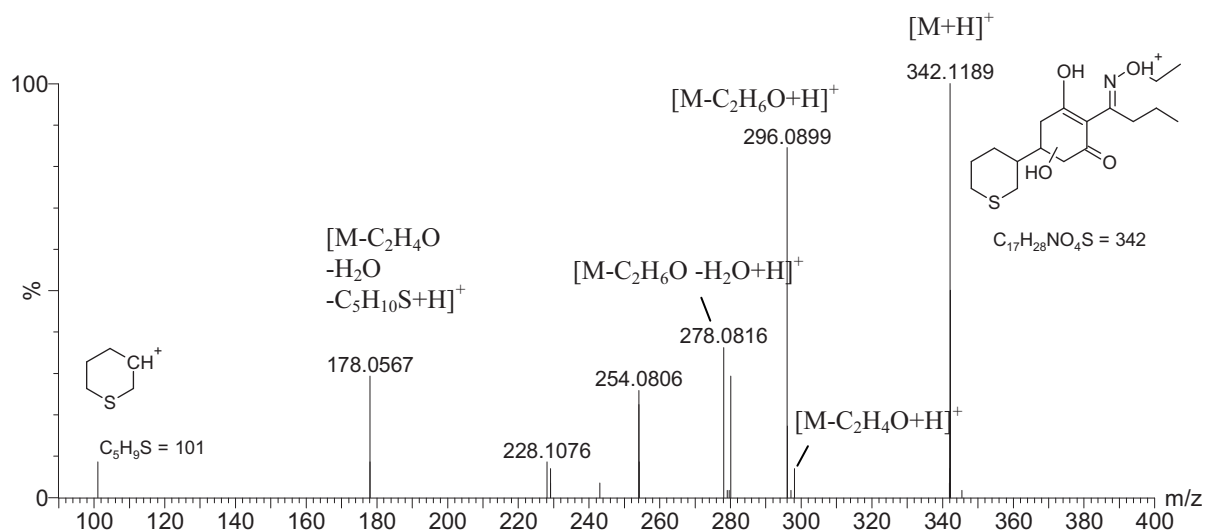


Figure VII.6b: Spectre de masse de la fragmentation de l'ion 342 (MS/MS).

La formule brute de l'ion est C₁₇H₂₈NO₄S. Cet ion possède un atome d'oxygène supplémentaire par rapport à l'ion [CD+H]⁺. Comme dans le cas précédent, l'oxydation peut avoir lieu soit sur le cyclohexane soit sur l'atome de soufre. L'examen détaillé de la fragmentation indique que l'oxydation a lieu sur le cyclohexane. En effet, parmi les fragments de l'ion 342 analysés par MS/MS, on distingue un ion de m/z égal à 101 qui correspond exactement à l'ion tétrahydro-thiopyrane et un ion de m/z égal à 178 qui correspond à la perte neutre d'éthanol, d'eau et du cycle C₅H₁₀S. La structure la plus plausible de ce photoproduit est proposée à la Figure VII.6a. Tout comme CD, ce composé perd par fragmentation l'éthoxylate. Il existe plusieurs isomères de ce composé selon la position de l'hydroxyle de la molécule (voir Figure VII.1 et VII.2).

La Figure VII.7a présente la structure proposée pour le photoproduit D. L'analyse par spectrométrie de masse en mode positif de ce photoproduit conduit à l'ion de m/z 358 dont le spectre de fragmentation est donné Figure VII.7b.

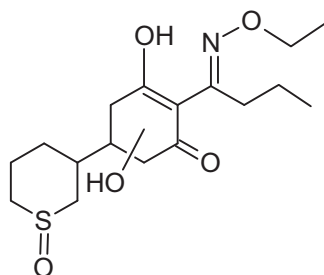


Figure VII.7a : Photoproduit D.

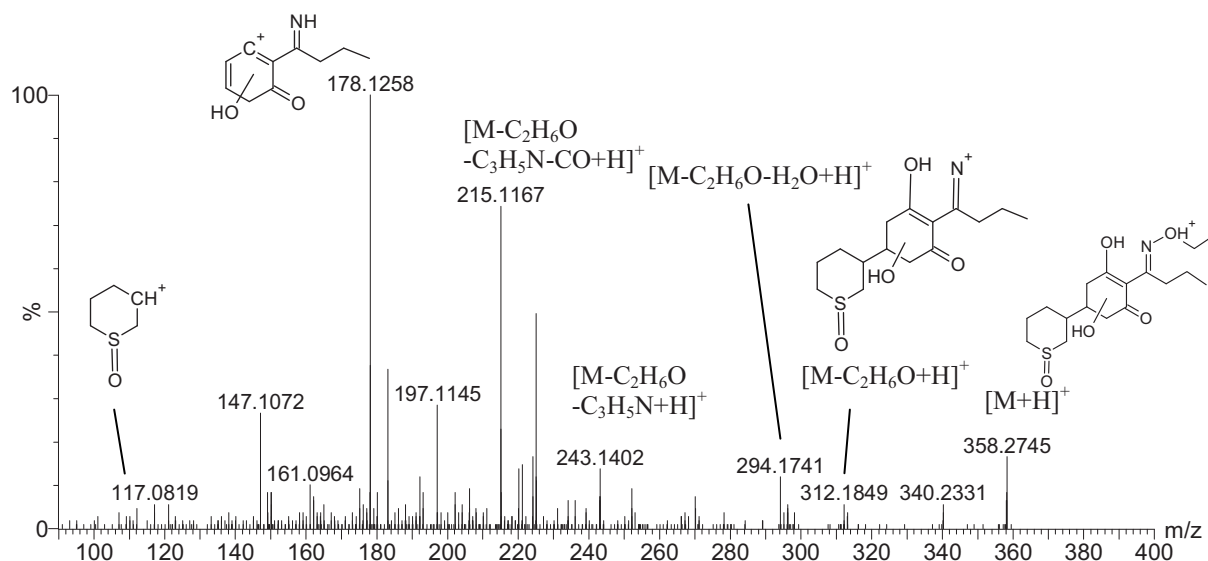


Figure VII.7b : Spectre de masse MS/MS de la fragmentation de l'ion 358.

La formule brute de l'ion 358 est $C_{17}H_{28}NO_5S$. Cet ion possède deux atomes d'oxygène supplémentaires par rapport à l'ion $[CD+H]^+$. Parmi les fragments de l'ion 358 analysés par MS/MS, on distingue un ion de m/z égal à 117 qui correspond à l'ion tétrahydro-thiopyrane-oxyde. Ce résultat prouve que l'atome de soufre a été oxydé. La deuxième oxydation a fort probablement lieu sur le cyclohexane. Il existe plusieurs isomères pour cette structure selon la position du groupement hydroxyle sur le cyclohexane, la plus probable serait l'addition du groupement hydroxyle en position β des carbonyles, qui par perte du proton acide (position α) favorise la perte d'eau.

5.3 Produits issus de l'oxydation de la cire

La figure VII.8a présente la structure du produit E. La protonation de cette molécule conduit à l'ion de masse 341 de formule brute $C_{22}H_{45}O_2$. La formule brute de ce produit indique qu'une longue chaîne d'alcane a été oxydée. L'alcane provient nécessairement du support solide qui est constitué de cire de paraffine. Aucune extraction de la cire avec l'acétonitrile n'a été observée auparavant. Dans ce cas-ci, il est probable que cet alcane étant oxydé, soit devenu suffisamment polaire pour être solubilisé dans l'acétonitrile. Le spectre de masse de la fragmentation de l'ion 341 est donné à la Figure VII.8b. Cet ion conduit au fragment 296, Ceci peut-être expliqué par la perte du radical $\cdot COOH$ à partir de l'ion 341.

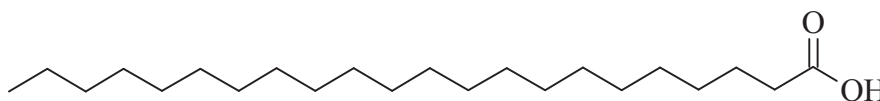


Figure VII.8a : Structure du produit d'oxydation E.

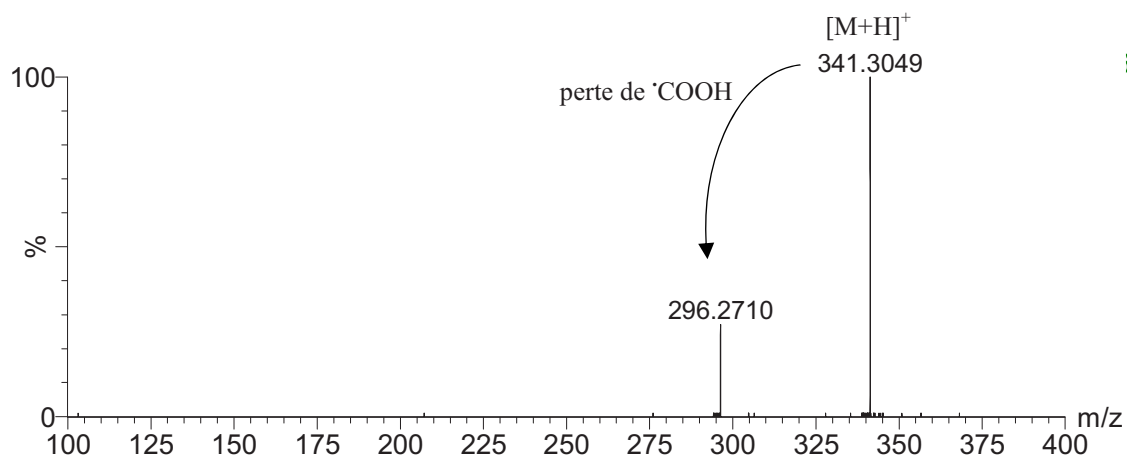


Figure VII.8b: Spectre de masse MS/MS de la fragmentation de l'ion 341.

La Figure VII.9a représente la structure du produit F. La protonation de cette molécule conduit à l'ion de masse 369 de formule brute $C_{24}H_{49}O_2$. De même que pour le produit E, ce composé est issu de la cire de paraffine. Le spectre de masse MS/MS de l'ion 369 conduit au fragment de masse 324 Figure VII.9b.

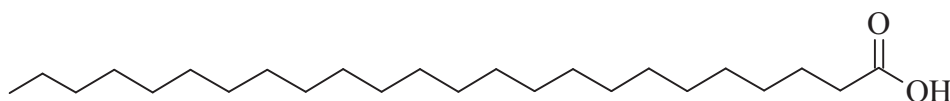


Figure VII.9a : Structure du produit d'oxydation F.

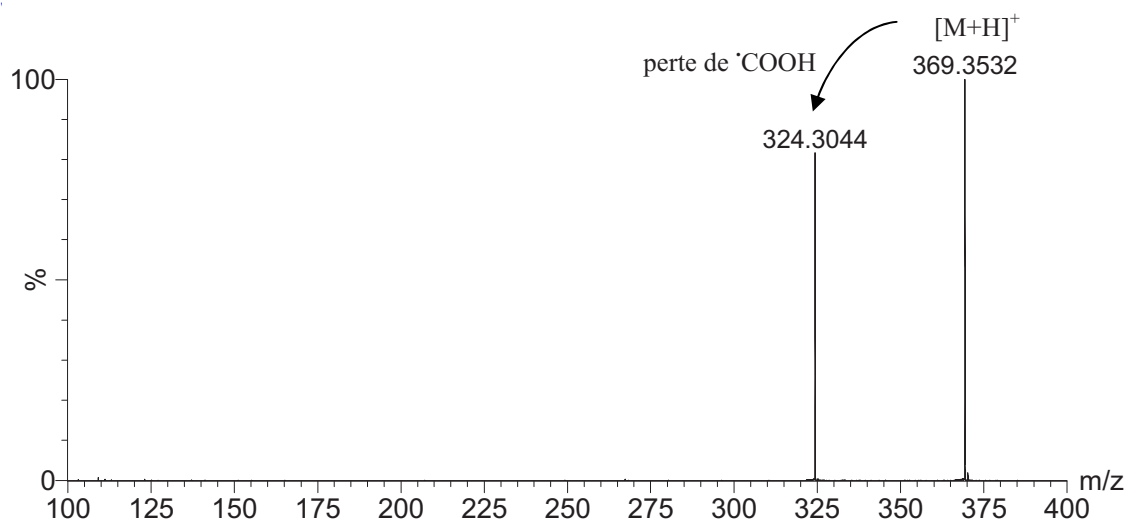


Figure VII.9b : Spectre de masse MS/MS de la fragmentation de l'ion 369.

Ces résultats sont importants car ils montrent que les alcanes constitutifs des cires peuvent être oxydés. Quand la détection se fait par UV-Visible, aucune détection des photoproduits correspondants aux ions 369 et 341 n'est possible au-dessus de 230 nm.

6. Suivi au cours du temps des photoproduits sur support solide

Nous présentons dans ce paragraphe les chromatogrammes HPLC-DAD de CD photolysé sur film de cire au Suntest à 500 Wm^{-2} après différents temps d'irradiation. Les photoproduits A, B et C ont été identifiés sur la base de leurs temps de rétention et de leurs spectres d'absorption qui sont donnés Figure VII.10.

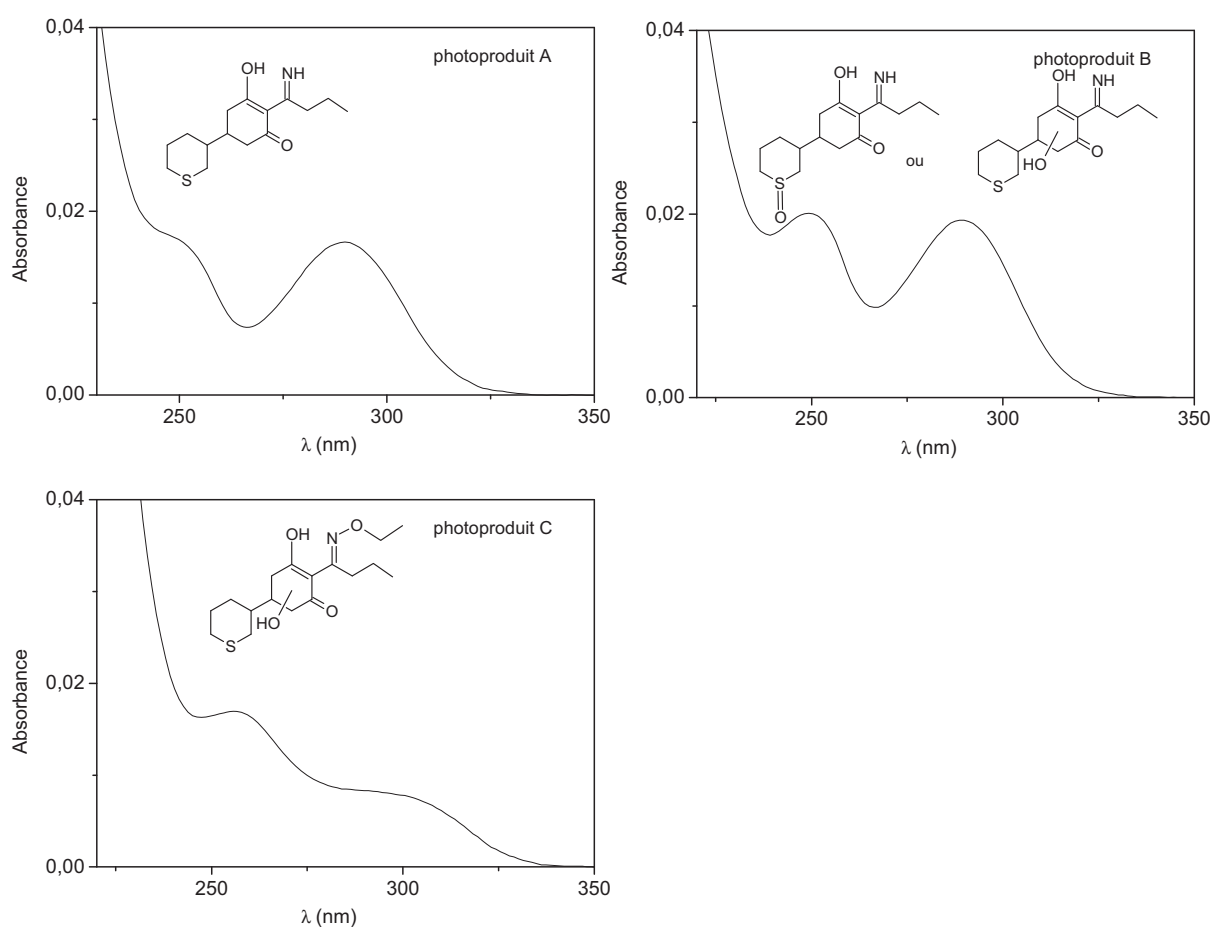


Figure VII.10: Spectres d'absorption des principaux photoproduits formés sur support solide.

6.1 CD sur cire de paraffine pure

La Figure VII.11 présente les chromatogrammes à 280 nm. Les trois photoproduits A, B et C peuvent être aisément détectés à cette longueur d'onde.

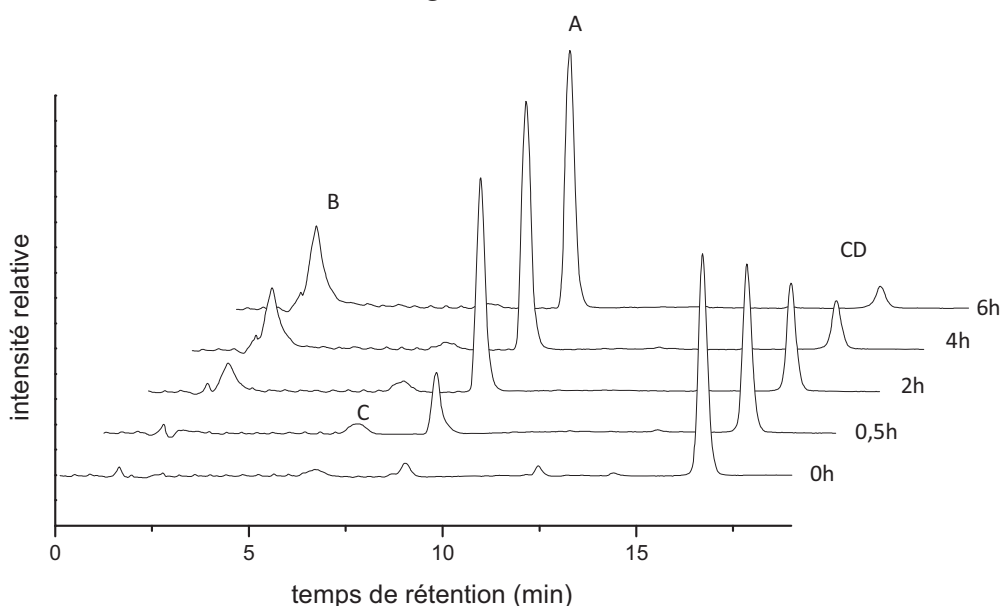


Figure VII.11 : Chromatogrammes HPLC des solutions de CD après photodégradation sur cire de paraffine pure.

Après 6 heures d'irradiation, la phototransformation de CD est pratiquement complète. Le composé A s'accumule bien qu'il absorbe aussi le rayonnement incident (voir spectre d'absorption Figure VII.10) alors que le composé C se forme et disparaît. Le composé B n'est pas visible après 30 min mais il le devient bien à partir de 2 h d'irradiation. C'est donc un photoproduit secondaire. Il semble assez logique de proposer que B se forme essentiellement à partir de C.

6.2 CD sur film de cire contenant K

La Figure VII.12 présente les chromatogrammes obtenus lorsque CD est irradié sur film de cire contenant K. Les trois principaux photoproduits sont une fois de plus détectables. On peut constater aussi qu'une partie du sensibilisateur est solubilisé dans le solvant de rinçage à $t=0$. En revanche, K n'est plus détectable dans les échantillons irradiés rincés bien que son temps de rétention soit proche de celui de C. On constate que l'on forme beaucoup plus de C et beaucoup plus de B et un peu moins de A que sur cire pure.

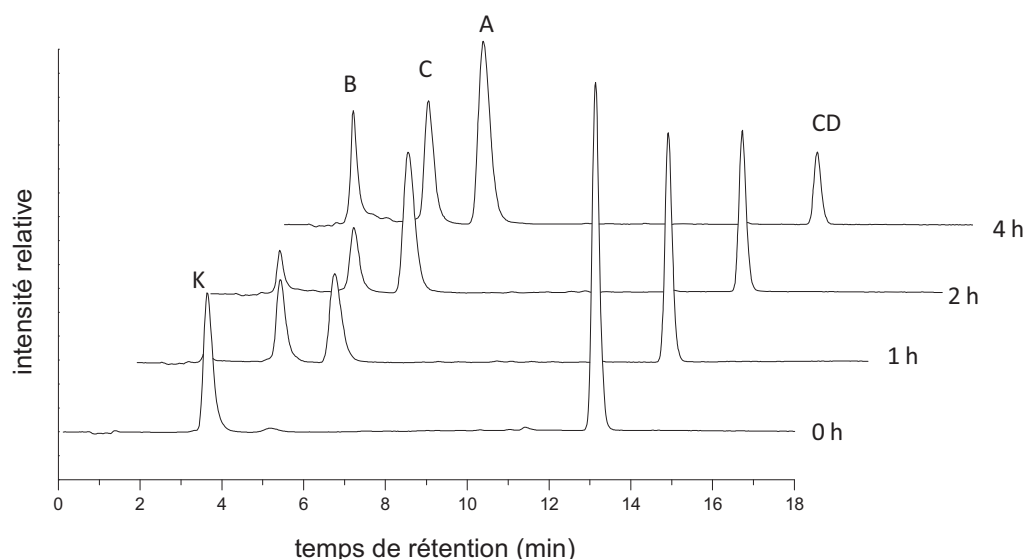


Figure VII.12 : Chromatogramme UV-visible de photodégradation de CD sur film de cire contenant K.

Dans le tableau VII.2, nous avons rassemblé les surfaces des pics mesurées. Cela permet une comparaison des quantités de photoproduits formés, à la valeur du coefficient d'absorption près. Les aires des pics correspondant à chaque photoproduit ont été relevées pour plusieurs taux de conversion de CD. Comme on peut le voir, lorsque le taux de conversion de CD est compris entre 24 et 36 %, le produit majoritaire formé sur cire pure est A. Sur cire contenant K, il se forme plus de A que sur cire pure mais surtout 5 fois plus de C. B est quasiment inexistant. A 50% de conversion de CD, A s'accumule sur les deux supports, tandis que l'aire de C varie peu. Le résultat important est que C est surtout visible en présence de K et que B est visible sur les 2 supports à partir de ce taux de conversion, il est formé en plus grande quantité en présence de K. Lorsque le taux de conversion de CD est compris entre 70 et 75%, on constate que A est quasiment dans les mêmes proportions sur les deux supports, tandis que C continue de s'accumuler sur le support contenant le sensibilisateur ce qui n'est pas le cas sur cire pure.

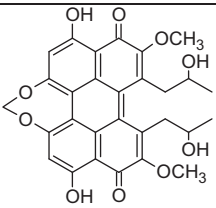
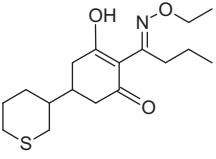
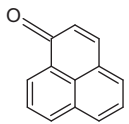
Tableau VII.2 : Comparaison des quantités de photoproduits formés sur cire pure et cire contenant K.

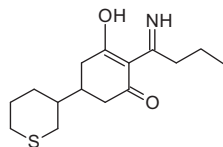
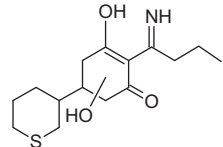
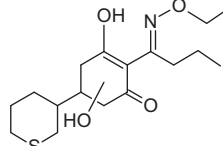
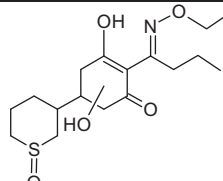
nature du support	Aire des photoproduits x1000			taux de conversion de CD (%)
	A	B	C	
cire pure	1,79	0	0,51	24
cire +K	3,16	0,31	2,43	36
cire pure	5,88	1,35	0,56	52
cire +K	4,92	3,76	2,1	52
cire pure	7,08	2,63	0,42	75
cire + K	6,5	2,33	3,40	70

7. Discussion

Nous avons récapitulé dans le tableau VII.3 les principaux photoproduits détectés et caractérisés.

Tableau VII.3 :

molécule	m/z	structure
CSP	535	
CD	326	
P	181	

molécule	m/z	structure
A	282	
B	298	
C	342	
D	358	
E	341	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{20}-\text{COOH}$
F	369	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{22}-\text{COOH}$

Le photoproduit A se forme par départ du groupe éthoxyle. C'est un photoproduit primaire qui se forme principalement par irradiation de CD en solution et sur cire. On l'observe également en présence de P. Ceci est dû soit à de la photolyse directe qui est minime mais non nulle à 365 nm ($A=0,06$) soit à de la sensibilisation par transfert d'énergie. Ce photoproduit n'étant pas observé à 435 nm en présence de CSP, on choisit plutôt la première explication.

Le photoproduit C qui est primaire est formé suite à l'oxydation du cyclohexane. Cette oxydation se produit par photolyse directe et surtout par réaction sensibilisée. En accord avec ceci, le rendement quantique de phototransformation de CD est plus élevé en présence qu'en l'absence d'oxygène. Par ailleurs, CD réagit avec l'oxygène singulet. Les molécules possédant des fonctions S ou SH sont facilement oxydables¹, on aurait donc pu s'attendre à oxyder le soufre.

Le photoproduit B est secondaire. Il est formé suite à la perte du groupe éthoxyle et à l'oxydation du cyclohexane. Il est formé quand CD est irradié pur et quand CD est irradié à 365 nm en présence de P. Quand CD est pur, il est raisonnable de proposer que B est issu de la photo-oxydation de A (voir Schéma VII.1). En présence de sensibilisateur, il semble donc logique de proposer que B se forme essentiellement à partir de C (voir Schéma VII.2).

Le photoproduit D est issu d'une double oxydation : celle du cyclohexane et celle du soufre. Cette fois, on observe bien l'oxydation du soufre.

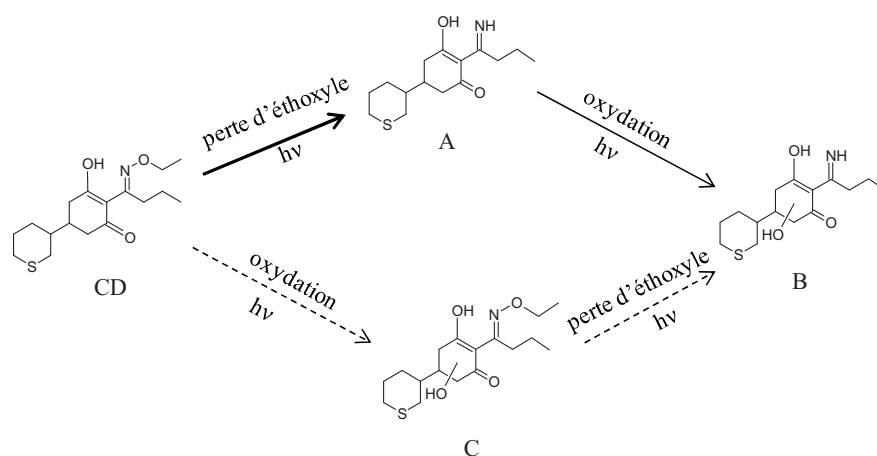


Schéma VII.1 : Mécanisme de formation des photoproduits A, B et C sur cire de paraffine pure.

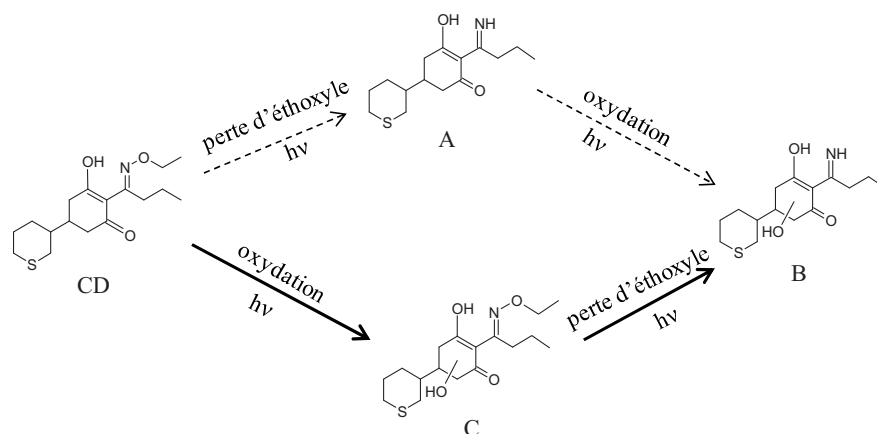


Schéma VII.2 : Mécanisme de formation des photoproduits A, B et C sur film de cire contenant un sensibilisateur.

Les molécules présentant la fonctionnalité éther d'oxime ont été étudiées en photochimie. La photoisomérisation de la fonction oxime est souvent décrite². Nous n'avons pas observé cette réaction. Ceci pourrait être dû à la stabilisation de l'isomère *E* du fait de la liaison intramoléculaire entre le N et le H du OH.

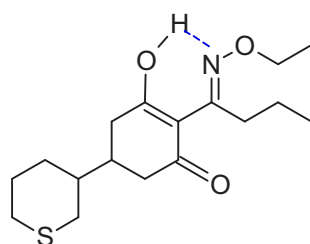


Figure VII.13 : Structure de l'isomère *E* de la cycloxydime stabilisée par la liaison intramoléculaire.

Hormis les composés E et F qui proviennent de la cire de paraffine et non de la cycloxydime, tous les composés ont été identifiés dans le rapport de l'EFSA comme produits issus de l'hydrolyse ou de la métabolisation dans les plantes.

Une préoccupation importante concerne la toxicité des photoproduits. Dans le cas de la phototransformation de CD, nous avons détecté le composé D qui possède une fonction sulfoxyde. Pour cette raison, nous avons cherché à connaître la toxicité des pesticides possédant des fonctions sulfoxyde ou sulfone par rapport à leurs analogues soufrés. Le terbufos est un insecticide dont les produits d'oxydation sont le terbufos sulfoxyde et le terbufos sulfone. Ces derniers ont une toxicité semblable à celle du composé parent vis-à-vis des organismes aquatiques³. Le fipronil est aussi un insecticide. Ses principaux produits de dégradation sont le fipronil sulfone et le fipronil desulfinyl. Selon Hainzl. et al., le fipronil sulfone est plus toxique que le fipronil sulfoxyde pour les oiseaux et plus toxique que le fipronil pour certains mammifères⁴. Il semble donc que l'oxydation sur l'atome de soufre sur ces pesticides ne diminue pas la toxicité de la substance active mais au contraire elle peut

l'amplifier. Cette remarque étant valable pour le phorate, l'aldicarb le disulton et le terbufos, il est plausible qu'il en soit de même pour CD. Toutefois la toxicité de la substance active n'est pas forcément liée à la fonction soufrée puisque dans le cas du fipronil, le produit de photodégradation ayant perdu la fonction soufrée, le fipronil desulfinyl, est au moins aussi toxique que la molécule parent⁴. Nous ignorons la toxicité de CD lorsque l'oxydation a lieu sur le cyclohexane.

8. Conclusion

Cette étude des photoproduits fait ressortir trois points principaux :

- Les produits issus de la photolyse directe sont différents de ceux obtenus par la voie sensibilisée. La perte de l'éthoxyle est purement du direct et la double oxydation du cyclohexane et du soufre essentiellement par la voie sensibilisée.
- On montre qu'il y a oxydation des constituants de la cire en présence de sensibilisateur.
- La phénalénone et la cercosporin conduisent à des résultats très semblables en solution.

Références

1. Lacombe, S.; Cardy, H.; Simon, M.; Khoukh, A.; Soumillion, J. P.; Ayadim, M. Oxidation of sulfides and disulfides under electron transfer or singlet oxygen photosensitization using soluble or grafted sensitizers. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 347-354.
2. De Lijser, H. J.; Tsai, C.-K. Photosensitized reactions of oxime ethers: a steady-state and laser flash photolysis study. *J. Org.Chem.* **2004**, *69*, 3057-3067.
3. Lee, M. C.; Anderson, B.; Elzerman, A. W. Photochemical oxidation of terbufos. *Environ. Toxicol. Chem.* **1999**, *18*, 1349-1353.
4. Hainzl, D.; Cole, L. M.; Casida, J. E. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 1529-1535.

CHAPITRE VIII

PHOTOSENSIBILISATION PAR LA CERCOSPORIN

1. Introduction

Tout comme les plantes, il existe des champignons pathogènes qui sont capables de synthétiser des phototoxines. Ces derniers emploient le même mécanisme que chez les plantes pour produire de l'oxygène singulet. Dans ce chapitre, nous nous sommes particulièrement intéressés à une phototoxine fongique, la cercosporin. Les champignons foliaires de la famille de *Cercospora* qui produisent cette toxine causent des préjudices économiques sur les grandes cultures telles que le maïs, la betterave sucrière, le soja, la banane, le café et le tabac. Or l'herbicide présenté au chapitre V, la cycloxydime, est employée sur les cultures de maïs et de tabac. Il se trouve que cet herbicide est réactif vis-à-vis de l'oxygène singulet (voir chapitre V).

Sachant que la cercosporin est un sensibilisateur ayant un Φ_{Δ} très élevé dans de nombreux solvants^{1,2} ($\Phi_{\Delta} > 0,8$) et qu'il absorbe largement dans le visible pour induire des réactions sensibilisées, nous avons voulu étudier son effet sur la cycloxydime.

Dans la première partie nous présentons les analyses en solutions. Ces analyses portent sur la réactivité entre la cycloxydime et la cercosporine dans l'acétonitrile.

Dans un second temps, nous avons tenté de travailler sur des échantillons réels en contaminant des feuilles de tabac par le *Cercospora* pour mesurer ensuite la photodégradation du pesticide déposé sur leurs surfaces.

La préparation du milieu de culture et la contamination de feuilles de tabac sont décrites dans le chapitre matériel et méthodes. Les analyses nécessitant un taux de pureté élevé telles que les analyses par photolyse laser flash et les mesures de vitesse de réaction en solution ont été réalisées avec de la cercosporin commerciale.

2. Bibliographie

Parmi les phototoxines des phytopathogènes, on dénombre les pérylènes quinones qui sont des photosensibilisateurs synthétisés par au moins huit types de champignon (*Alternaria*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Elsinoe*, *Hypocrella*, etc.)¹. La cercosporin est une pérylène quinone produite par les phytopathogènes *Cercospora* (voir Figure VIII.1).

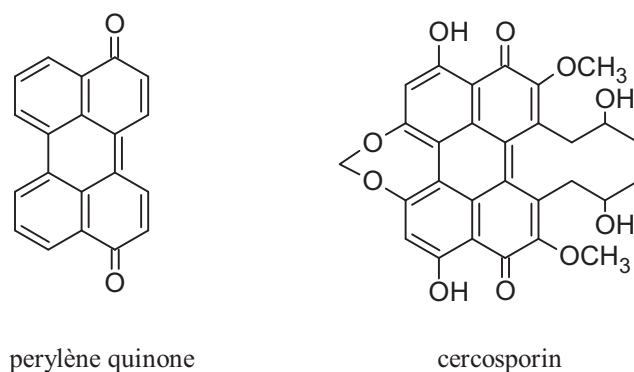
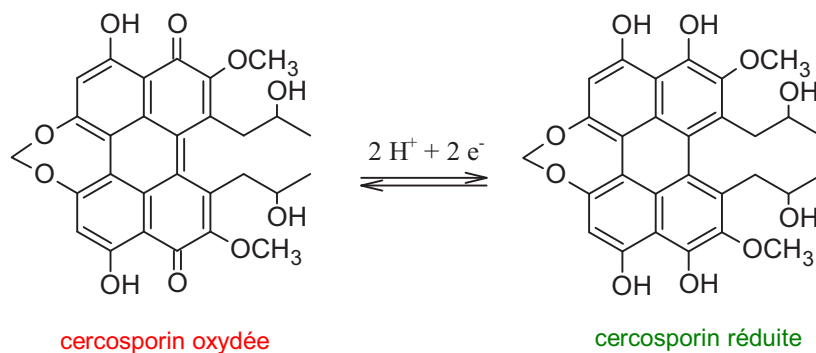


Figure VIII.1 : Exemple de pérylène quinone et structure chimique de la cercosporin.

Il existe près de 500 espèces de *Cercospora* mais toutes ne produisent pas de la cercosporine ; seules les espèces produisant la toxine risquent d'endommager la plante. Les espèces mutantes produisant peu de cercosporin ne montrent aucune lésion sur les feuilles inoculées¹. De plus, la toxine n'est capable de tuer les cellules des plantes uniquement lorsqu'elle est exposée à la lumière, avec une relation linéaire entre l'intensité lumineuse et la mortalité des cellules³. La cercosporin est un sensibilisateur d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) et de radical anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Toutefois il a été mis en évidence que la formation du $^1\text{O}_2$ est le mécanisme principal de la cercosporin⁴. Contrairement aux espèces actives telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle (HO^{\cdot}) qui sont des produits secondaires du métabolisme cellulaire et pour les quelles les cellules renferment des systèmes de défenses, l'oxygène singulet n'est pas un composé courant et les cellules ne le tolèrent pas¹.

Le champignon agit en pénétrant dans les stomates des plantes et colonise l'espace intracellulaire en produisant la toxine. La cercosporin est une molécule soluble dans les lipides et qui pénètre rapidement les membranes cellulaires. En présence de lumière, la toxine produit de l' $^1\text{O}_2$ qui détruit les membranes lipidiques en les oxydants et tue ainsi les cellules. La rupture de la membrane cellulaire apporte les nutriments nécessaires à la croissance et à la sporulation du champignon. L' $^1\text{O}_2$ est une espèce létale quasiment pour tous les organismes. De ce fait, la cercosporine est une toxine non-spécifique qui est létale non seulement aux plantes mais aussi aux bactéries, virus ainsi que la plupart des champignons et animaux. Les seuls organismes résistants à la cercosporin identifiés jusqu'à présent sont les espèces *Cercospora* et les autres espèces de champignons produisant des perylènes quinones. Les *Cercospora* ont un mode de détoxification élaboré : la toxine est convertie sous sa forme réduite qui est non-photoactive (Figure VIII.2). A l'intérieur de la cellule fongique, la cercosporin est sous forme réduite, mais se réoxyde spontanément sous sa forme photoactive

dès excrétion. Cette molécule présente l'avantage d'être colorée et facilement localisable. La cercosporin est un composé rouge qui émet une fluorescence dans le rouge tandis que la forme réduite est verte et également fluorescente¹. La toxicité de la molécule est due à la forme oxydée : le Φ_{Δ} de la forme oxydée est environ de 0,81 dans les solvants organiques alors que les dérivés de sa forme réduite ont des Φ_{Δ} inférieurs à 0,14 (ref^{1,2,5}).



3. Analyses en solution

3.1 Spectres d'absorption et de fluorescence

Les réactions entre la cycloxydime (CD) et la cercosporin (CSP) en solution ont été menées dans l'acétonitrile. Afin de choisir la longueur d'excitation du CSP, nous avons tracé le spectre d'absorption de celui-ci dans l'acétonitrile. Ce spectre a été tracé pour le CSP commercial et le CSP extrait du mycélium ce qui nous a permis d'évaluer la qualité de ce dernier (Figure VIII.3).

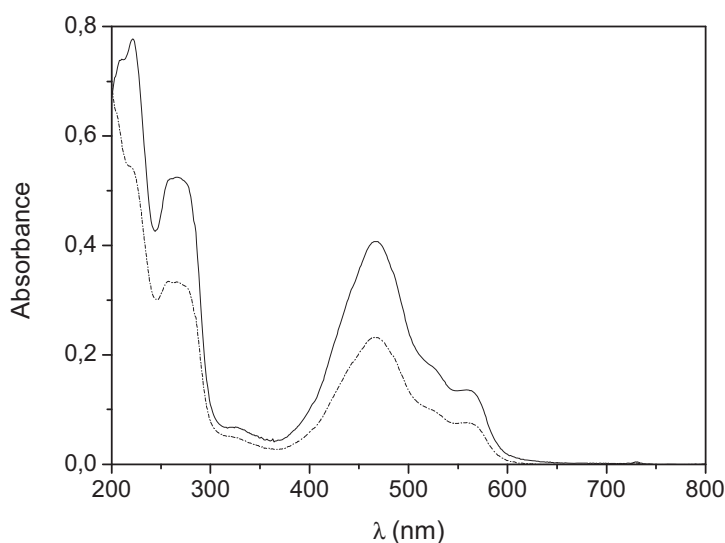


Figure VIII.3 : Spectre d'absorption du CSP dans l'acétonitrile. CSP commerciale (trait plein) et extraite du mycélium (pointillé).

Les quantités disponibles en CSP commerciale et extraite étant trop faibles pour effectuer des pesées, les concentrations molaires des solutions n'ont pu être déterminées. Il en découle que les coefficients d'extinction de la molécule n'ont pu être calculés. Pour cette raison, dans la suite des résultats présentés, seule l'absorbance de la solution de CSP est exprimée.

Le CSP présente un large spectre d'absorption qui s'étend jusqu'à 650 nm. Il présente deux maxima : 267 nm et 468 nm. La cycloxydime (CD) n'absorbe pas au-delà 400 nm, le CSP peut donc être sélectivement excité à une longueur d'onde pour étudier les réactions sensibilisées entre le CSP et le CD. Le spectre de CSP obtenu dans l'acétonitrile est identique à celui tracé dans le benzène, donné dans la littérature⁶.

De plus, le spectre d'absorption du CSP extrait a la même allure que le CSP commercial ce qui est un premier indicateur sur la pureté de l'extrait.

Les spectres d'émission de fluorescence du CSP commercial et extrait dans l'acétonitrile sont représentés à la Figure VIII.4. La longueur d'onde d'excitation est de 466 nm. Le maximum d'émission observé est à 615 nm.

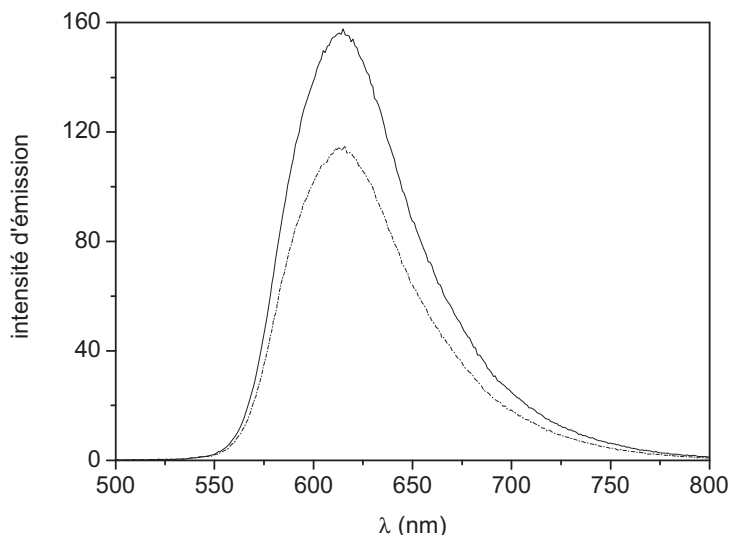


Figure VIII.4 : Spectre d'émission de fluorescence du CSP dans l'acétonitrile, forme commerciale (trait plein) et extraite du mycélium (pointillé).

3.2 Réactions sensibilisées entre la cercosporin et la cycloxydime

Nous savons que CD est un herbicide réactif à $^1\text{O}_2$ et que CSP est une phototoxine qui produit cette dernière. Toutefois, avant de procéder à des expériences sur support solide, c'est-à-dire sur des feuilles de tabac contaminées par le *Cercospora*, nous avons entrepris les expériences en solution dans l'acétonitrile. Bien que la réaction soit à priori évidente, cette expérience nous a permis de mesurer le Φ_Δ de CSP dans l'acétonitrile.

La procédure d'analyse est identique à celle décrite dans l'article « Reactivity of cycloxydim toward singlet oxygen in solution and on wax film » du chapitre V. Le Φ_{CD} a été mesuré pour différentes concentrations de CD (5×10^{-5} à 3×10^{-4} M) en maintenant la concentration de CSP constante ($A_{435 \text{ nm}} = 0,24$). Les solutions ont été irradiées avec une source monochromatique à 435 nm de manière à exciter sélectivement le CSP. La régression linéaire obtenue après avoir tracé $1/\Phi_{\text{CD}}$ en fonction de $1/[\text{CD}]$ est donnée Figure VIII.5.

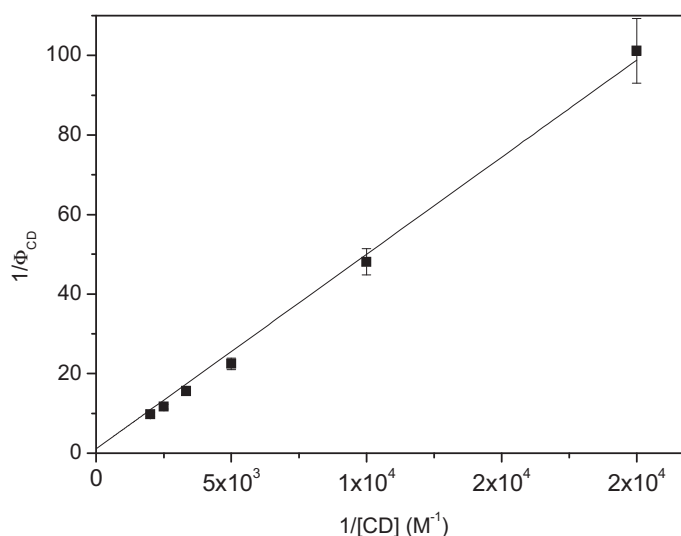


Figure VIII.5 : Régression linéaire du tracé de $1/\Phi_{CD}$ en fonction de $1/[CD]$.

L'ordonnée à l'origine vaut 1,12 et la pente de la droite obtenue vaut $4,89 \times 10^{-3} M$. Selon l'équation ci-dessous, l'ordonnée à l'origine est égale à $1/\Phi_{\Delta}$.

$$\frac{1}{\Phi_{CD}} = \frac{1}{\Phi_{\Delta}} \left(1 + \frac{k_d}{[CD]k_t} \right)$$

Le Φ_{Δ} de CSP dans l'acétonitrile est égal à $0,89 \pm 0,2$. Cette valeur est très proche des celles données dans le benzène, l'éthanol et le méthanol deutéré ($\Phi_{\Delta} = 0,81$)².

3.3 Spectre du transitoire

Spectre du transitoire est obtenu pour une solution de CSP commerciale. La longueur d'onde du tir est de 266 nm ($A_{266} = 0,56$). Le transitoire est tracé à la fois pour une solution aérée et désoxygénée (Figure VIII.4).

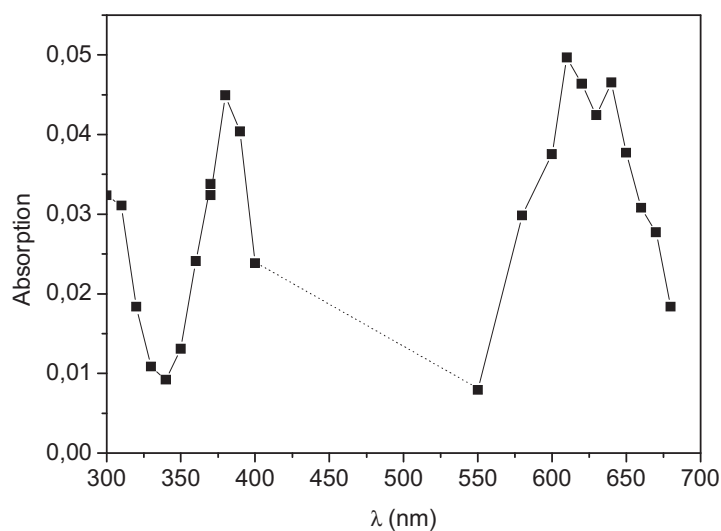


Figure VIII.4 : Spectre d'absorption du transitoire de CSP dans l'acétonitrile aéré tracé 0,1 μs après le pulse.

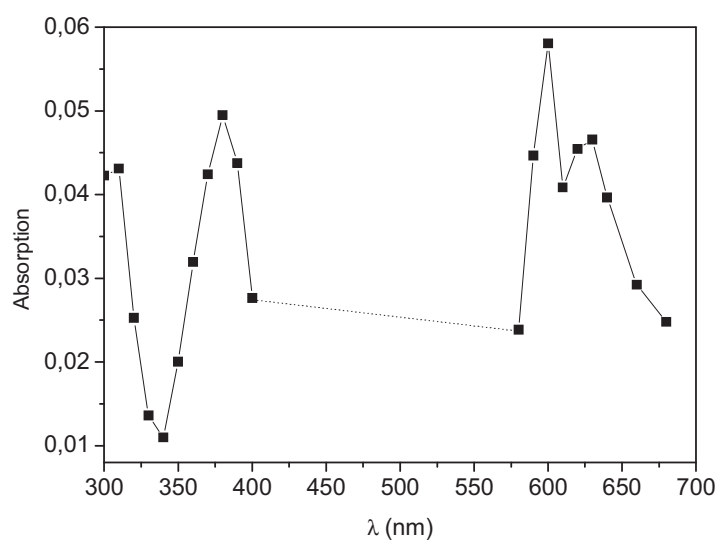


Figure VIII.5 : Spectre d'absorption du transitoire de CSP dans l'acétonitrile désoxygéné tracé 0,1 μs après le pulse.

Une solution de CSP préparée dans l'acétonitrile ($A_{266 \text{ nm}} = 0,56$) est excitée sous impulsion laser à 266 nm. La valeur du k_d du CSP mesuré est de $(4,7 \pm 0,1) \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ sous air et de $(4,9 \pm 0,3) \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ sous argon. La concentration en oxygène étant de $2,4 \times 10^{-3} \text{ M}$ dans l'acétonitrile⁷, on peut déduire que la constante de désactivation du $^3\text{CSP}^*$ avec l'oxygène (k_{O_2}) est de $(1,9 \pm 0,3) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

4. Contamination des feuilles de tabac

Pour imiter les conditions environnementales, nous avons tenté de contaminer des plantes de tabac par le *Cercospora* pour étudier l'influence de celle-ci sur la phototransformation de CD. Les diverses techniques ont été mises en place pour contaminer la plante entière, mais elles ont été infructueuses.

La contamination a donc été opérée sur feuilles de tabac détachées selon le mode opératoire décrit dans le chapitre II. Au bout d'une semaine de contamination de la feuille de tabac maintenue sur le mycélium, les lésions sont visibles. Une solution de CD a ensuite été déposée sous forme de microgouttelettes de 2 μ l de manière à atteindre une concentration surfacique de 200 g/ha. Après évaporation du solvant, les feuilles ont été irradiées au Suntest à 500 W m⁻². Malheureusement les feuilles se flétrissent déjà après 10 minutes d'irradiation du fait qu'elles sont déjà endommagées par le *Cercospora*. Les mesures de vitesse de phototransformation de CD sur les feuilles contaminées n'ont pu être menées.

Une perspective serait de maintenir les feuilles de tabac détachées moins longtemps sur le mycélium pour éviter leur flétrissement.

Références

1. Daub, M. E.; Ehrenshaft, M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2000**, *38*, 461-490.
2. Redmond, R. W.; Gamlin, J. N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 391-465.
3. Daub, M. E. Cercosporin, a photosensitizing toxin from *Cercospora* species. *Phytsiolo. Biochem.* **1982**, *72*, 370-374.
4. Daub, M. E.; Hangarter, R. P. Light-induced production of singlet oxygen and superoxide by the fungal toxin, cercosporin. *Plant Physiol.* **1983**, *73*, 855-857.
5. Aminian-Saghafi, T.; Nasini, G.; Caronna, T. ; Braun, A. M. ; Oliveros, E. Quantum yields of singlet-oxygen production by some natural quinoid fungal metabolites and derivatives. *Helv. Chim. Acta*, **1992**, *75*, 531-538.
6. Diwu, Z.; Lown, J. W. Photosensitization by anticancer agents. 12. Perylene quinonoid pigments, a novel type of singlet oxygen sensitizer. *J. Photochem. Photobiol. A.: Chem.* **1992**, *64*, 273-287.
7. Franco, C.; Olmsted, J. I. Photochemical determination of the solubility of oxygen in various media. *Talanta* **1990**, *37*, 905-909.

CONCLUSION GENERALE

Les pesticides sont des composés employés sur les grandes cultures pour augmenter les rendements agricoles. Leur utilisation massive conduit à la contamination des différents compartiments de l'environnement. Pour cette raison, le Grenelle de l'environnement a instauré le plan Ecophyto qui vise à une réduction de l'utilisation des pesticides de 50 % et à l'interdiction des composés jugés les plus préoccupant d'ici 2018.

Afin de maintenir les rendements agricoles et la qualité des récoltes tout en réduisant les doses d'application des pesticides, il est essentiel de rendre les traitements sur les cultures plus efficaces. Une des solutions est de limiter les pertes entre le moment où le composé est pulvérisé sur la plante et le moment où il atteint sa cible pour remplir sa fonction. Il est donc nécessaire d'étudier les phénomènes qui entraînent la perte du composé lors d'un épandage et après dépôt du phytosanitaire sur la plante. Parmi ces différents phénomènes, nous nous sommes intéressés à la photodégradation des substances actives. **La photodégradation est un inconvénient en particulier lorsqu'elle a lieu sur la surface du végétal** puisqu'elle entrave l'action de la molécule. **Ce point est pourtant très peu documenté.**

L'objectif de cette thèse était de comprendre la photodégradation de deux matières actives dans les conditions les plus proches des conditions réelles après dépôt sur les feuilles. Notre choix s'est porté sur le **chlorothalonil** et la **cycloxydime**.

Bien que le chlorothalonil soit une molécule qui est disponible sur le marché depuis près d'une quarantaine d'années, il n'existait pas concrètement de données sur sa photochimie à la surface des végétaux lorsque nous avons entrepris ce travail. Le peu de littérature qui traite de sa photochimie traite des compartiments eaux et sols. Cette molécule possède des substituants très électro-attracteurs (quatre atomes de chlore et deux groupements nitriles) et serait à priori photoréductible. C'est aussi un fongicide à longue persistance qui doit pouvoir préserver ses propriétés sur une période suffisante pour maintenir son efficacité. Ces raisons nous ont poussés à étudier sa photochimie en détail. La cycloxydime, quant à elle, a été choisie parmi divers pesticides testés pour sa réactivité avec l'oxygène singulet. De plus, il n'existe strictement aucune littérature sur le devenir de cette molécule hormis son dossier d'homologation.

Au cours de ce travail, nous avons étudié la phototransformation directe du chlorothalonil, puis la phototransformation directe et sensibilisée de la cycloxydime en utilisant la phénalénone comme sensibilisateur modèle. Les réactions photosensibilisées entre les métabolites secondaires des plantes et les pesticides ont également été abordés. **Ce dernier aspect, non décrit dans la littérature, nous a permis de montrer que les métabolites secondaires des plantes peuvent jouer un rôle important dans la vitesse de phototransformation des substances actives.**

La première partie de ce travail a été consacrée au chlorothalonil. Afin de comprendre le mécanisme réactionnel de cette molécule, une série d'analyses ont été menées en solution. L'influence d'oxygène et de composés donneurs d'atome H sur la vitesse de photoréaction du chlorothalonil a en particulier été examinée.

Le principal intermédiaire réactionnel, l'état excité triplet, a été caractérisé grâce à la technique de photolyse laser. Parce que cet état excité triplet réagit avec l'oxygène atmosphérique nous avons vérifié sa capacité à produire de l'oxygène singulet. Nous avons découvert une **propriété remarquable du chlorothalonil qui est sa capacité à former de l'oxygène singulet avec un rendement quantique proche de 1**. De plus, ce transitoire est très oxydant et se fait réduire par des donneurs H, même par les alcanes.

L'étude de la phototransformation sur support solide a été conduite dans un simulateur de lumière solaire et sur la cire de paraffine pour reproduire la surface foliaire. La durée de demi-vie de photodégradation du chlorothalonil pur extrapolée aux conditions environnementales est de 5 jours. Le temps de demi-vie est réduit en présence des agents d'étalement présents dans les formulations commerciales. **Finalement nous avons montré que le chlorothalonil accélère la phototransformation des pesticides réactifs vis-à-vis de l'oxygène singulet comme la cycloxydime.**

La réactivité de onze pesticides avec l'oxygène singulet a ensuite été mesurée. Parmi ceux-ci, la cycloxydime a été retenue pour une étude plus détaillée.

La seconde partie a été dédiée à la cycloxydime et aux réactions sensibilisées. Cet herbicide présente plusieurs structures du fait d'équilibres tautomériques céto-énoliques et de l'isomérisation *E/Z* de la fonction éther d'oxime. Ces équilibres sont fonction du solvant. Vu la complexité et le nombre d'isomères possibles de cette molécule, nous nous sommes consacrés à l'identification de l'isomère le plus abondant dans l'acétonitrile, principal solvant employé au cours de ce travail. La résonance magnétique nucléaire nous a permis de constater que **la molécule est majoritairement sous forme E et énol, stabilisée par une liaison intramoléculaire entre le OH de l'énol et l'azote de l'oxime**. Par des expériences en solution, nous avons ensuite prouvé que **la cycloxydime réagit avec l'oxygène singulet** en employant la phénalénone comme sensibilisateur. Ce résultat nous a poussés à vérifier si la réaction sensibilisée avait lieu lorsque le sensibilisateur était inclus dans un support solide et la cycloxydime étant déposée dessus. **Nous avons observé que le temps de demi-vie de phototransformation de la cycloxydime sur cire pure était de seulement 2 h à 500 Wm⁻² et qu'elle était encore davantage réduite en présence de phénalénone dans la cire de paraffine.**

Dans la continuité des irradiations sur support solide, l'influence du volume de dépôt, de la taille des gouttes, de la présence d'agent d'étalement et de la nature de la surface a été examinée. Comme pour le chlorothalonil, la présence d'agent d'étalement augmente la vitesse de phototransformation du composé. Ces résultats ont montré que **la distribution des substances actives sur le support après séchage était un paramètre important.**

Nous avons examiné la réactivité de la cycloxydime en présence cette fois de sensibilisateurs naturellement présents dans les plantes. Certaines plantes sont capables de synthétiser des phototoxines qui produisent de l'oxygène singulet en présence de lumière solaire. Nous avons sélectionné des phototoxines commerciales de plante afin de mesurer leurs réactivités avec la cycloxydime. Les phototoxines choisies sont **la khellin et le visnagin**. Dans un premier temps en solution, nous avons pu déterminer la part de photolyse directe et sensibilisée grâce à des mesures en irradiation continue dans l'acétonitrile aérée ou désoxygénée, ainsi que des mesures par photolyse laser. Nos résultats ont montré qu'en présence d'oxygène, une part importante de la photodégradation de la molécule est attribuée à de la photolyse directe et le reste à de la photodégradation à la voie sensibilisée. Dans un second temps, les phototoxines ont été incluses dans la cire de paraffine et la cycloxydime a été déposée par-dessus. **Les phototoxines augmentent la vitesse de phototransformation du pesticide même lorsqu'ils sont inclus dans la cire.**

Il est aussi intéressant de noter que les phototoxines choisies ont des rendements quantiques de production d'oxygène singulet trois à quatre fois inférieurs à ceux de la phénalénone. Néanmoins la cycloxydime réagit à la fois par des réactions de photo-oxydation de type I (espèce radicalaires) et de type II (oxygène singulet). Ceci signifie que même si certaines phototoxines naturelles produisent peu d'oxygène singulet, il n'est pas exclu qu'elles dégradent la substance active par un autre mécanisme tel que des réactions de type I à condition dans ce cas que les réactifs soient en contact.

Nous avons cherché à mesurer les rendements quantiques de production d'oxygène singulet des phytoalexines khellin et visnagin dans un environnement proche duquel se trouvent ces métabolites dans les plantes. Les propriétés physico-chimiques de ces deux sensibilisateurs sont en effet fortement dépendantes du milieu. Nous avons réalisé cette expérience en recréant un modèle de cuticule foliaire. Ceci a été réalisé en incluant la phototoxine et une sonde chimique à oxygène singulet, le 1,3-diphénylisobenzofurane, dans la cire de paraffine pour ensuite former des films de paraffine d'environ 100 µm. **Ce concept nouveau, nous a permis de mesurer des vitesses de production d'oxygène singulet pour la première fois dans des films de paraffine.**

Une étude des photoproduits a également été entreprise. Par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse et à un détecteur UV-Visible nous avons pu proposer des structures chimiques pour les photoproduits. Nous avons identifié les photoproduits de la cycloxydime issus de la photolyse directe et de la réaction sensibilisée à la fois en solution et lorsque la cycloxydime est déposée sur les films de cire contenant des sensibilisateurs. Nous avons également pu différencier les photoproduits primaires et secondaires. Le principal photoproduit de photolyse directe résulte de la perte de l'éthoxyle sur la cycloxydime tandis que les produits d'oxydation sont essentiellement formés par voie sensibilisée. **Par ailleurs, nous n'avons pas observé de photoisomérisation de la cycloxydime.** Ce résultat surprenant vient consolider notre hypothèse sur la formation de liaison intramoléculaire de l'isomère *E*-

énol de la cycloxydime ; cette liaison intramoléculaire « bloquerait » la photoisomérisation de la molécule.

Enfin, un dernier chapitre traite brièvement de l'influence de la cercosporin, phototoxine fongique, sur la cycloxydime. La cercosporin est aussi un sensibilisateur d'oxygène singulet. Nous avons étudié son influence sur la cycloxydime en solution. Puis nous avons tenté de contaminer des plantes de tabac pour que le *Cercospora* produise la phototoxine directement sur les feuilles et pour déposer ensuite la cycloxydime sur les feuilles. Nous sommes parvenues à contaminer des feuilles de tabac par le *Cercospora* mais nous n'avons pu procéder à mesurer des vitesses de phototransformation de la cycloxydime sur les feuilles contaminées du fait que celles-ci se flétrissent rapidement après irradiation.

Nous pouvons souligner les points qui méritent une attention particulière :

- La réactivité photochimique du chlorothalonil nous a montré que cette molécule est un excellent sensibilisateur d'oxygène singulet. Le chlorothalonil est d'ailleurs capable de sensibiliser la phototransformation de la cycloxydime. Ce résultat suggère que des précautions particulières doivent être prises lors de l'épandage simultané de plusieurs pesticides.
- Nous avons pu montrer que les réactions sensibilisées peuvent avoir lieu même lorsque le sensibilisateur est inclus dans le support solide (cire de paraffine) et que la cycloxydime est déposée dessus. Ce phénomène est d'ailleurs appuyé par la formation de produit d'oxydation de la cire.
- La cycloxydime est une molécule qui se distingue des autres composés contenant des fonctions éther d'oximes. La structure majoritairement formée dans l'acétonitrile ne se photoisomérise pas du fait qu'elle est stabilisée par une liaison intramoléculaire.

Pour finir, il conviendrait de compléter nos résultats par l'analyse des espèces transitoires qui peuvent être formés lorsqu'un sensibilisateur est présent dans la cire. Ces mesures permettraient de comprendre les réactions de transfert énergétique sur l'oxygène qui sont en compétition avec les réactions conduisant à la réduction du sensibilisateur. En complexifiant progressivement le système, il serait intéressant d'étudier l'influence d'autres constituants de la cire sur la formation des espèces transitoires.

La phototransformation des matières actives à la surface des plantes après pulvérisation a une influence considérable sur l'efficacité des traitements. Dans ce travail, l'ensemble des réactions photochimiques se produisant sur des supports modèles des cires végétales dans des conditions proches des conditions environnementales ont été étudiées dans le cas d'un fongicide (le chlorothalonil) et d'un herbicide (la cycloxydime). Nous avons considéré les réactions photochimiques induites par l'absorption de lumière par les composés eux-mêmes et celles faisant intervenir des sensibilisateurs comme les métabolites secondaires des plantes. Dans chacun des cas, des études mécanistiques détaillées ont été conduites.

Nous montrons que le chlorothalonil possède la capacité remarquable de produire de l'oxygène singulet avec un rendement quantique proche de l'unité. En parallèle, la réactivité de la cycloxydime avec l'oxygène singulet a été montrée. De ce fait, la phototransformation de la cycloxydime sur film de cire est accélérée lorsque des sensibilisateurs naturels, tels que les phytoalexines sont ajoutés à la cire, ou lorsque des traces de chlorothalonil sont présents à la surface du modèle foliaire.

Ce travail a permis 1) de comprendre le mécanisme de phototransformation par excitation directe et sensibilisées du chlorothalonil) et de la cycloxydime, 2) de mesurer de nombreuses données physico-chimiques (constantes de vitesse de réaction, rendements quantiques, durées de vie, caractéristiques spectrales de transitoires) et 3) de mettre au point un protocole expérimental permettant d'étudier la photochimie de molécules à l'état solide incluses dans des films de cire.

The phototransformation of active ingredients on plant surfaces after spraying has a significant impact on the treatment efficiency. In this work, the photochemical reactions taking place on leaf models and environmental conditions close to real ones have been overviewed for two pesticides: chlorothalonil and cycloxydim. We considered the photochemical reactions induced by light absorption by the compounds themselves and the reactions involving natural sensitizers such as plants secondary metabolites. Detailed mechanistic studies were conducted.

We show that chlorothalonil has a noteworthy capacity to produce singlet oxygen with a quantum yield close to unity. Besides, the reactivity of cycloxydime towards singlet oxygen was demonstrated. Hence, the phototransformation of cycloxydime deposited on wax films is accelerated when natural sensitizers, such as phytoalexins, are included in the wax, or when chlorothalonil traces are present on the leaf model.

This work allowed 1) to understand the mechanism of phototransformation by direct excitation and sensitization of chlorothalonil and cycloxydime, 2) to measure many physico-chemical data (reaction rate constants, quantum yields, lifetime, spectral characteristics of transients and 3) to put in work an experimental protocol for the photochemical study of organic compounds in solid state and included in wax films.